

Federal Republic of Germany

Priority Certificate on the Granting  
of a Patent Application

File No.: 101 60 151.4  
Application date: 7 December 2001  
Applicant/proprietor: Ribopharma AG,  
Bayreuth/DE  
Title: Method for inhibition of the expression of a given target gene in a cell  
IPC: C 12 N 15/63

The appended documents are a true and exact reproduction of the original documents of this patent application.

Munich, 5 December 2002  
German Patent and Trademark Office  
The President  
On authority  
[signature]

**Dzierżewski**

Method for inhibition of the expression of a given target gene in a cell

The invention concerns a method as is known, e.g., from WO00/44895.

The problem of the invention is to indicate a method, medicament, and use of improved effectiveness for the inhibition of the expression of a given target gene in a cell. In particular, the method, medicament and use should be applicable in vivo.

This problem is solved by the features indicated in the claims.

The method advantageously enables a particularly effective inhibition of the expression of a target gene in vivo. The dsRNA claimed according to the invention is characterized by a good efficacy, while at the same time having higher serum stability. Surprisingly, the dsRNA can be taken up and applied in a suitable solution, such as an intravenous one. It is not necessary to take special measures to introduce the dsRNA into the cell.

Sample embodiments:

#### **In vivo study – sample embodiment**

Double-stranded RNA (dsRNA), derived from the GFP (green fluorescing protein) sequence, was injected i.v. into “GFP laboratory mice”, which express the GFP in all cells carrying on protein biosynthesis. At the end of the experiment, the animals were sacrificed and the GFP expression was investigated in cross sections of the kidney and in the serum as compared to animals who had received the dsRNA not derived from the GFP sequence.

Experiment protocol

Synthesis of the dsRNA

Keeping of the experimental animals and conduct of the experiment

The transgenic laboratory mouse strain TgN (GFPU) 5Nagy was used (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), which expresses GFP (with a beta-actin promotor and a CMV intermediate early enhancer) in all cells thus far investigated (Hadjantonakis AK et al., 1993, Mech. Dev 76: 79-90). GFP-transgenic mice can be clearly distinguished from the corresponding wild types (WT) by means of the fluorescence (with a UV flashlight). For the breeding, each corresponding WT was paired with a heterozygotic GFP type.

The investigation was conducted in accordance with the German animal protection provisions. The animals were kept under controlled environmental conditions in groups of 3-5 animals in type III Macrolon cages from the firm Ehret, Emmendingen, at a constant temperature of 20 degrees C and a light/dark rhythm of 12 h. The sawdust litter used was softwood granules 8/15 of the firm Altromin, Lage. The animals received tap water and standard feed Altromin 1324 in pellets (Altromin) ad libidum.

For the experimental procedure, the heterozygotic GFP animals were kept in cages by groups of 3 animals. The injections were given i.v. in the tail vein at a 12 h frequency for 5 days. The injection volume was 60 µl per 10 g of animal and the dose was 2.5 mg of dsRNA or 50 µg per kg of animal. The partitioning into groups was as follows: group A consisted of 6 animals and received PBS (phosphate buffered saline), group B, 2 animals, received 2.5 mg of a control dsRNA (S1 control) per kg, group C, 6 animals, received 2.5 mg of another control dsRNA (S7 control) per kg, group D, 6 animals, received 2.5 mg of dsRNA (GFP-specific, hereafter designated as S1) per kg, group E, 6 animals, received 2.5 mg of dsRNA (GFP-specific, hereafter designated as S7) per kg, and group F, 6 animals, received 50 µg of S1 dsRNA per kg. After the last injection, the animals were killed at a time interval of 14-20 h and organs and blood were harvested.

#### Organ harvesting

Immediately after the killing of the animals, blood and various organs were removed (thymus, lung, heart, spleen, stomach, intestine, pancreas, brain, kidney and liver). The organs were briefly rinsed in cold, sterile PBS and cut up with a sterile scalpel. One part was fixed in Methyl Carnoys (MC, 60% methanol, 30% chloroform, 10% glacial acetic acid) for 24 h for immunohistochemical staining; one part was immediately shock-frozen in liquid nitrogen and kept at -180 degrees C for frozen sections and for protein isolation; and another, smaller part was frozen at -80 degrees C for RNA isolation in RNAeasy-Protect (Qiagen). The blood was kept on ice immediately after being withdrawn, centrifuged for 5 min at 2000 rpm (Mini spin, Eppendorf), and serum was drawn off and kept at -80 degrees C.

#### Processing of the biopsies

After 24 h fixation in MC, the biopsies were dehydrated in an increasing alcohol series at RT: every 490 min, 70% methanol, 80% methanol, 2 x 96% methanol and 3 x 100% isopropanol. After this, the tissues were heated in the incubator in 100% isopropanol at 60 degrees C, then incubated for 1 h in an isopropanol/paraffin mixture at 60 degrees C and 3x for 2 h in paraffin, and finally embedded in paraffin. For immunoperoxidase stains, tissue sections of 3 µm thickness were prepared with a rotation microtome (Leika), pulled onto a slide (Superfrost, Vogel) and incubated for 30 min at 60 degrees C in the incubator.

#### Immunoperoxidase staining for GFP

The sections were deparaffinized in xylene 3 x 5 min, rehydrated in a decreasing alcohol series (3 x 3 min 100% ethanol, 2 x 2 min 95% ethanol), and then incubated for 20 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/methanol for blocking of endogenous peroxidases. After 3 x 3 min washing with PBS, incubation was done with the first antibody (goat-polyclonal anti-GFP, Santa Cruz Biotechnology) 1:500 with 1% BSA/PBS over night at 4 degrees C. The incubation with the biotinylated secondary antibody (1:2000 dilution) took place for 30 min at RT, and then incubation was done for 30 min with Avidin D Peroxidase (1:2000 dilution, Vector Laboratories). After each antibody incubation, the sections were washed 3 x 3 min in PBS. All antibodies were diluted in 1% bovine serum albumen (BSA). The staining with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) was carried out with the DAB Substrate Kit (Vector Laboratories) according to the manufacturer's instructions. Hematoxylin III was used as the nuclear counterstaining per Gill (Merck). After the dehydration in an ascending alcohol series and 3 x 5 min xylene, the sections were encased in Entellan (Merck). The microscopic evaluation of the staining was done by the IX50 microscope of Olympus, outfitted with a CCD camera (Hamamatsu).

#### SDS gel electrophoresis for separation of serum proteins

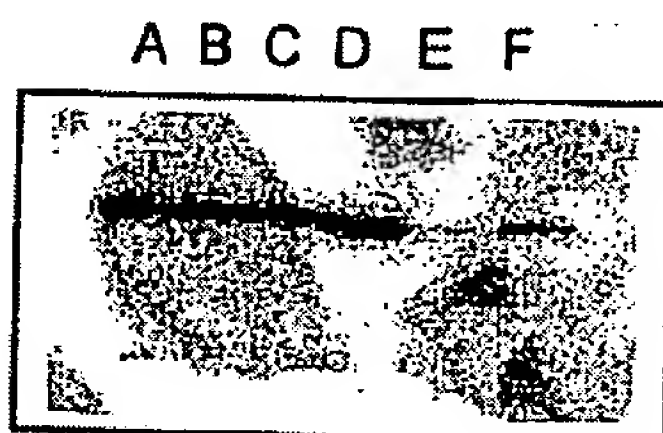
The electrophoretic separation of the serum proteins was done in a Multigel-Long electrophoresis chamber from Biometra with a denaturing, discontinuous 15% SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) after Lämmli (Nature 277: 680-685, 19970). For this, a separation gel was first poured with 1.5 mm thickness: 7.5 ml acrylamide/bis-acrylamide (30%, 0.9%), 3.8 ml of 1 M Tris/HCl, pH 8.4, 150 µl of 10% SDS, 3.3 ml of Aqua bidest., 250 ml of ammonium persulfate (10%), 9 µl of TEMED (N,N,N',N'-tert.methylene diamine) and coated with 0.1% SDS until polymerization was complete. After this, the collection gel was poured: 0.83 ml of acrylamide/bis-acrylamide (30%, 0.9%), 630 ml of 1 M Tris/HCl, pH 6.8, 3.4 ml of Aqua bidest., 50 µl of 10% SDS, 50 µl of 10% ammonium persulfate, 5 µl of TEMED.

Before being applied onto the gel, every 3 µl of serum was combined with 6 µl of Aqua bidest. and 3 µl of 4x specimen buffer (200 mM Tris, pH 6.8, 4% SDS, 100 mM DTT (dithiotreitol), 0.02% bromophenol blue, 20% glycerol), denatured for 5 min in the heating block at 100 degrees C, briefly centrifuged after cooldown on ice and then applied to the gel. The run was water cooled at RT and constant 50 V. The length standard used was the protein gel marker.

#### Western Blot and immune detection

The transfer of the proteins from the SDS-PAGE onto a PVDF (polyvinyl difluoride) membrane (Hybond-P, Amersham) was done in the semidry technique after Khyse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) at RT and a constant current strength of 0.8 mA/cm<sup>2</sup> for 1.5 h. The transbuffer used was a Tris/glycine buffer (39 mM glycine, 46 mM Tris, 0.1% SDS and 20% methanol). As a check for the electrophoretic transfer, both the gels after the blotting and the blot membranes after the immune detection were stained with Coomassie (0.1% Coomassie G250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid). For saturation of unspecific bonds, the blot membrane was incubated for 1 h at RT in 1% powdered skim

milk/PBS after the transfer. After that, washing was done three times each for 3 min with 0.1% Tween-20/PBS. All subsequent antibody incubations and washing steps were done in 0.1% Tween-20/PBS. The incubation with the primary antibody (goat-polyclonal anti-GFP) was done for 1 h at RT. After this, washing was done 3 x 5 min and incubation for 1 h at RT with the secondary antibody (donkey anti-goat IgG Ho[r]seradish Peroxidase labeled, Santa Cruz Biotechnology). The detection was done with the ECL system from Amersham, following the manufacturer's instructions.



#### **Inhibition of the GFP expression in the serum.**

3  $\mu$ l each of serum were separated in the 15% SDS-PAGE and quantified in the Western Blot: A) PBS control; B) K1 control (0-22-0); C) K3 control (2-19-2); D) D1 (0-22-2); E) S7 (2-19-2); F) S1 (1/50 of the D concentration).

#### **Inhibition of the gene expression of a target gene in cultivated HELA S3 cells and mouse fibroblasts by dsRNA**

The effectiveness of the inhibition of the YFP expression after transient transfection of a YFP-coding plasmid on the basis of RNA interference with dsRNAs can be modulated by configuring the 3' ends and the length of the base-paired region.

#### **Sample embodiment**

To demonstrate the effectiveness of the dsRNA in the specific inhibition of gene expression, transiently transfected NIH/3T3 cells (fibroblasts from NIH Swiss mouse embryo, ECCAC (European collection of animal cell culture) No. 93061524) and HELA-S3 (human cervical carcinoma cells, DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) No. ACC 161) were used. For the transfection, the plasmid pcDNA-YFP was used, containing an 800 bp-sized Bam HI/Eco RI-YFP fragment in the corresponding intersections of the vector pdDNA3. From the sequence of the yellow fluorescing protein (YFP), double-stranded RNAs (dsRNAs) derived therefrom were produced and transfected transiently into the fibroblasts, along with the pcDNA-YFP. After this, the decrease in fluorescence was evaluated as compared to cells without dsRNA and cells that were transfected with pcDNA-YFP and a control dsRNA (not derived from the YFP sequence).

#### **Experiment protocol**

##### **Synthesis of dsRNA**

By means of a RNA synthesizer (type Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) and traditional chemical methods, the single RNA strands shown in the sequence protocols and their complementary single strands were synthesized. After this, the crude synthesis products were purified by means of HPLC. The column NucleoPac PA-100 was used, 9 x 250 mm, from the Dionex company; the low salt buffer was 20 mM Tris, 10 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6.8, 10% acetonitrile, and the high salt buffer was 20 mM Tris, 400 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6.8, 10% acetonitrile. The flow rate was 3 ml/minute. The hybridization of the single strands to form the double strand was done by heating the stoichiometric mixture of single strands in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, 100 mM NaCl, to 80-90 degrees C and then slowly cooling down to room temperature over the space of 6 hours.

##### **Seeding out of the cells**

All cell culture work was done under sterile conditions in a corresponding work bench (HS18, Hera Safe, Kendro, Heraeus). The cultivation of the NIH/3T3 cells and the HELA-S3 was done in the incubator (CO<sub>2</sub>

incubator T20, Hera cell, Kendro, Heraeus) at 37 degrees C, 5% CO<sub>2</sub> and saturated humidity in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Biochrom), for the mouse fibroblasts, and Ham's F12 for the HELA cells with 10% FCS (fetal calf serum, Biochrom), 2 mM L-glutamine (Biochrom) and penicillin/streptomycin (100 IU/100 µg/ml, Biochrom). In order to keep the cells in the exponential growth phase, the cells were passaged every 3 days. Twenty four hours before performing the transfection, the cells were trypsinized (10x trypsin/EDTA, Biochrom, Germany) and seeded out with a cell density of  $1.0 \times 10^4$  cells per well in a 96-well plate (Multiwell dishes 96-well flat bottom, Labor Schubert & Weiss GmbH) in 150 µl of growth medium.

#### **Procedure for the transient transfection**

The transfection was carried out with Lipofectamine Plus™ Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. For each well, 0.15 µg of pcDNA-YFP plasmid was used. The total transfection volume was 60 µl. Each batch contained triple the samples. The plasmid DNA was first complexed together with the dsRNA. For this, the plasmid DNA and the dsRNA was diluted in serum-free medium and 1 µl of PLUS Reagent was used per 0.1 µg of plasmid DNA (in a volume of 10 µl) and incubated, after mixing, for 15 minutes at room temperature. During the incubation, 0.5 µl of Lipofectamine per 0.1 µg of plasmid DNA was diluted in a total of 10 µl serum-free medium, mixed well, added to the mixture of plasmid/dsRNA/PLUS and again incubated for 15 minutes. There was a change of medium during the incubation. For this, the cells were washed 1x with 200 µl of serum-free medium and then incubated further in the incubator with 40 µl of serum-free medium until the DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine was added. After the adding of 20 µl of DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine per well, the cells were incubated in the incubator for 2.5 hours. The cells were then washed 1x after the incubation with 200 µl of growth medium and incubated in the incubator for 24 hours in 200 µl of growth medium until the detection of fluorescence.

#### **Detection of fluorescence**

Twenty four hours after the last change of medium, the fluorescence of the cells was photographed on the fluorescent microscope (IX50-S8F2), fluorescence unit U-ULS100Hg, burner U-RFL-T200, Olympus) with a USH-I02D mercury lamp (USHIO Inc., Tokyo, Japan) outfitted with a WIB fluorescence cube and a digital CCD camera (Orca IIIIm, Hamamatsu) and C4742-95 camera controller). The evaluation of the fluorescent photographs was done with the analysis software 3.1 (Soft Imaging System GmbH, Germany). In order to relate the YFP fluorescence to the cell density, a staining of the nuclei (Hoechst staining) was performed. For this, the cells were first fixed for 5 minutes in 100 µl of Methycarnoy (75% methanol, 25% glacial acetic acid) and then once again for 10 minutes in Methycarnoy. After drying in air, the fixed cells were incubated in the dark with 100 µl per well of Hoechst dye (75 ng/ml). After washing twice with PBS (PBS Dulbecco w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Biochrom), the Hoechst-stained cells were photographed under the fluorescence microscope (Olympus, WU fluorescence cube for Hoechst).

Figures 1 to 5 show the inhibition of the YFP expression by dsRNA in cultivated mouse fibroblasts; Figures 1, 2 and 3 are graphs showing the effect of dsRNAs derived from the YFP sequence and that of control dsRNAs on the YFP expression in NIH/3T3 mouse fibroblasts after transient transfection, as described in the experiment protocol. The concentration of dsRNA is related to the concentration in the medium and indicated on the x-axis. The designation of the dsRNAs will be found in the "Sequences" table. The relative fluorescence per image segment in % area is shown. Three different image segments per well were evaluated. The mean values are obtained from the triple batches. Figures 4 and 6 show the specific inhibition of the YFP gene expression by dsRNAs in HELA-S3 cells.

Figure 5 shows representative fluorescence microscope photographs of transiently YFP-transfected NIH/3T3 mouse fibroblasts without dsRNA and with dsRNAs specifically directed against YFP (magnification 100x).

5A: YFP control

5B: S1, 10 nM

5C: S4, 10 nM

5D: S7, 10 nM

5E: S7/S12, 1 nM

5F: S7/S12, 1 nM



Figure 6 shows representative fluorescence microscope photographs of transiently YFP-transfected HELA-3S cells without dsRNA and with dsRNAs specifically directed against YFP (magnification 100x).

6A: K2 control, 10 nM

6B: S1, 10 nM

6C: S4, 10 nM

6D: S7, 10 nM

6E: S7/S11, 1 nM

6F: S7/S12, 1 nM

6G: S1A/S4B, 10 nM

6H: YFP control

## Conclusions

It can be seen from Fig. 1 that the inhibition of the YFP expression after transient transfection of mouse fibroblasts with the YFP plasmid along with dsRNAs specifically directed against the YFP sequence is suppressed especially effectively when the 3' ends of the regions of the dsRNAs containing 22 and 19 base pairs have single-stranded segments of 2 nucleotides. While the dsRNA S1 with smooth 3' ends shows no inhibitory effects on the YFP expression at a concentration of 1 nM (related to the concentration in the cell culture medium during the transfection procedure), the dsRNAs S7 (19 base-paired nucleotides) and S4 (22 base-paired nucleotides), each with 2 nt projections at both 3' ends, inhibit the YFP expression by 50% and 70%, respectively, as compared to the corresponding control dsRNAs K3 and K2, whose sequences are not derived from the YFP sequence. At a concentration of 10 nM, the dsRNA with smooth ends designated as S1 inhibits the YFP expression by around 65%, while the inhibition of the YFP expression by the S4 dsRNA amounts to around 93%. The inhibitory effect of the dsRNAs designated as S4 and S7 is dependent on the concentration (Fig. 1 and 2, see also Fig. 4).

Furthermore, it can be seen in Fig. 2 that the single-stranded configuration is not necessary at both 3' ends (on the sense and antisense strand) for the efficient suppression of the YFP gene expression. In order to achieve the most effective possible inhibition of the YFP expression, only the 2 nt projection at the 3' end on the antisense strand (the region complementary to the YFP-mRNA) is necessary. Thus, the inhibition of the YFP expression is around 70% at a concentration of 1 nM for both dsRNAs S4 (with 2 nt projections at both 3' ends) and S1A/S4B (with one 2 nt projection at the 3' end of the antisense strand). On the other hand, if the 2 nt projection is situated at the 3' end of the sense strand (and the 3' end of the antisense strand has no single-stranded region), the inhibition of the YFP gene expression is only 50%. Similarly, the inhibition at higher concentrations is distinctly better when at least the 3' end of the antisense strand has a 2 nt projection.

A further increase in the inhibition of the YFP expression is achieved when the base-paired region comprises 21 nucleotide pairs instead of 22 (S1 and S4) or 19 (S7). Thus, the inhibition of the YFP expression by S1 (22 base pairings with smooth ends) is around 40%, while the inhibition by S7/S12 (21 base pairings with smooth ends) is around 92%. If the dsRNA with 21 base pairings also contains a 2 nt projection on the antisense 3' end (S7/S11), the inhibition is around 97% (compared to around 73% inhibition by S4 and around 70% inhibition by S7).

## Investigation of the serum stability of the double-stranded RNA (dsRNA)

The goal is to further enhance the effectiveness found in the cell cultures of the inhibition provided by dsRNAs of the expression of target genes for a use *in vivo* through an increase in the effective concentration of the functional molecule by increasing the stability of the dsRNAs in serum and, thus, their residence time under *in vivo* conditions.

## Sample embodiment

The serum stability of the double-stranded oligoribonucleotides (dsRNA) inhibiting the GFP expression was tested *ex vivo* in murine and human serum.

## Experiment protocol

The incubation with human and murine serum with the corresponding dsRNA was done at 37 degrees C in a heating block. Each time, 85 µl of serum was incubated with 15 µl of 100 µM dsRNA. After definite incubation times (30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h), the samples were immediately frozen at -80 degrees C. This control used was dsRNA without serum (+85 µl ddH<sub>2</sub>O) and dsRNA with serum at time 0. For the isolation of the dsRNA from the incubation batch, which was done on ice, 400 µl of 0.1% SDS was added to each batch and a phenol extraction was done: 500 µl of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (IAA, 25:24:1, Roti® phenol, Roth, Karlsruhe) was added to each batch and this was vortexed for 30 seconds at the highest level (Vortex Genie-2; Scientific Industries). After 10 minutes incubation on ice, phase separation was done by centrifuging at 12,000 x g, 4°C, for 10 min (Sigma 3K30, Rotor 12131-H). The upper aqueous phase (around 200 µl) was taken off and subjected at first to a DNase I and then to a proteinase K digestion: adding of 20 µl of 10x DNase I buffer (100 mM Tris, pH 7.5, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) and 10 U of DNase I (D7291, Sigma-Aldrich), 30 min incubation at 37° C, further adding of 6 U of DNase I and incubation for another 20 min at 37° C, adding of 5 µl of proteinase K (20 mg/ml, 04-1075, Peggab, Germany) and 30 min incubation at 37° C. After this, a phenol extraction was performed. For this, 500 µl of phenol:chloroform:IAA (25:24:1) was added, vortexing at the highest level was done for 30 s, centrifuging at 12,000 x g for 10 min, 4° C, the supernatant was drawn off and combined in succession with 40 µl of 3 M Na-Ac (sodium acetate), pH 5.2, and 1 ml of 100% EtOH, mixing thoroughly in between, and precipitation was done for at least 1 h at -80° C. The precipitate was pelleted by centrifuging at 12,000 x g for 30 min and 4° C, washed with 70% EtOH and again centrifuged (10 min, 12,000 x g, 4° C). The air dried pellet was taken up in 30 µl of RNA gel application buffer (7 M urea, 1 x TBE (0.09 M Tris-borate, 0.002 EDTA (ethylene diamine tetra-acetate), 0.02% (w/v) bromophenol blue, 0.02% (w/v) xylene cyanol) and kept at -20° C until the gel application.

For the characterization of the dsRNA, an analytical, denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (analytical PAGE) was carried out. The urea gels were prepared shortly before the run: 7 M urea (21 g) was dissolved while stirring in 25 ml of 40% aqueous acrylamide/bis-acrylamide master solution (Rotiphoresis gel, A515.1, Roth) and 5 ml of 10 x TBE (108 g of Tris, 55 g of boric acid, 9.3 g of EDTA per L of Aqua dest.) and made up to 50 ml with Aqua dest. Shortly before being poured, 50 µl of TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine) and 500 µl of 10% APS (ammonium peroxydisulfate) were added. After the polymerization, the gel was placed into a vertical electrophoresis apparatus (Merck, Darmstadt) and a preliminary run was carried out for 30 min at constant 40 mA current strength. The run buffer used was 1 x TBE buffer. Before being applied to the gel, the RNA samples were heated at 100° C for 5 min, cooled on ice, and centrifuged for 20 s in a table centrifuge (Eppendorf, minispin). Fifteen µl at a time was applied to the gel. The run took place for around 2 h at a constant current flow of 40 mA. After the run, the gel was stained for 30 min at RT (room temperature) with Stains all solution (20 ml of Stains all master solution (200 mg of Stains all dissolved in 200 ml of formamide) combined with 200 ml of Aqua dest. and 180 ml of formamide) and the background staining was then removed by rinsing in Aqua dest. for 45 min. The gels were photographed with the photodocumentation system Image Master VDS of Pharmacia.

Figures 7 to 14 show the serum stability of the dsRNA after incubation with human and murine serum and subsequent electrophoretic separation in the 20% 7 M urea gel.

Fig. 7: incubation of S1 (0-22-0) in murine serum

1. at time 0 (without serum)
2. at time 0
3. for 30 minutes
4. for 1 hour
5. for 2 hours
6. for 4 hours
7. for 12 hours
8. 2 µl of 100 µM S1 without incubation
- S1A) sense S1 (10 µl of 20 µM S1A)
- S1B) antisense S1 (10 µl of 20 µM S1B)

Fig. 8: incubation of S1 (0-22-0) in human serum

1. 2 µl of 100 µM S1 untreated (without incubation)

2. for 30 minutes
3. for 2 hours
4. for 4 hours
5. for 6 hours
6. for 8 hours
7. for 12 hours
8. for 24 hours

S1A) sense S1 (10  $\mu$ l of 20  $\mu$ M S1A)

S1B) antisense S1 (10  $\mu$ l of 20  $\mu$ M S1B)

Fig. 9: Incubation of S7 (2-19-2) in murine serum

1. at time 0 (without serum)
2. for 30 minutes
3. for 4 hours
4. for 12 hours

Fig. 10: Incubation of S7 (2-19-2) in human serum

1. sense S7 (10  $\mu$ l of 20  $\mu$ M S7A)
2. antisense S7 (10  $\mu$ l of 20  $\mu$ M S7B)
3. for 30 minutes
4. for 1 hour
5. for 2 hours
6. for 4 hours
7. for 6 hours
8. for 12 hours
9. for 24 hours
10. at time 0 (without serum)

Fig. 11: Incubation of K3 (2-19-2) in murine serum

1. sense K3 (10  $\mu$ l of 20  $\mu$ M K3A)
2. antisense K3 (10  $\mu$ l of 20  $\mu$ M K3B)
3. at time 0 (without serum)
4. at time 0 (with serum)
5. for 30 minutes
6. for 1 hour
7. for 2 hours
8. for 4 hours
9. for 12 hours

Fig. 12: Incubation of PKC1/2 (0-22-2) in murine serum

1. for 30 minutes
2. for 1 hour
3. for 2 hours
4. for 4 hours
5. for 12 hours
6. 2  $\mu$ l of 100  $\mu$ M of PKC1/2 (untreated)

Fig. 13: Incubation of S1A/S4B (0-22-2) in human serum

1. at time 0 (without serum)
2. for 24 hours
3. for 12 hours
4. for 8 hours
5. for 6 hours
6. for 4 hours
7. for 2 hours
8. for 30 minutes

9. sense K3 (10  $\mu$ l of 20  $\mu$ M K3A)

10. antisense K3 (10  $\mu$ l of 20  $\mu$ M K3B)

Fig. 14: Incubation of K2 (2-22-2) in human serum

1. sense K2 (10  $\mu$ l of 20  $\mu$ M K2A)



2. antisense K2 (10  $\mu$ l of 20  $\mu$ M K2B)
3. at time 0 (without serum)
4. for 30 minutes
5. for 2 hours
6. for 4 hours
7. for 6 hours
8. for 8 hours
9. for 12 hours
10. for 24 hours

## Conclusions

dsRNAs without single-stranded regions at the 3' ends are much more stable in both human and murine serum than dsRNAs with single-stranded 2 nt projections at the 3' ends (Fig. 7 to 11 and 14). After 12 and 24 hours incubation of S1 in murine and human serum, respectively, a band of the original size is still almost fully preserved. On the contrary, the stability in human as well as murine serum decreases significantly for dsRNAs with 2 nt projections at both 3' ends. Already after 4 hours incubation of S7 (Fig. 9 and 10) or K3 (Fig. 11), the band can no longer be detected in its original size. The length of the base-paired region has no influence on the stability, as shown by a comparison of the serum stability of K2 (22-, Fig. 14) with S7 and K3.

In order to increase the stability of dsRNA in serum, it is sufficient for the dsRNA to have a smooth end. In the murine serum, the band is hardly reduced in its original size after 4 hours incubation (Fig. 12, track 5) as compared to S7 (after 4 hours total breakdown, Fig. 9, track 3).

**$\Rightarrow$  Combination of serum stability and efficiency in the inhibition of target genes: the use of dsRNA with one smooth end and one single-stranded region of 4 nucleotides can be seen as the optimal compromise in terms of biological efficacy of dsRNA, and the single-stranded projection at the 3' end of the sequence complementary to the target gene must be located on the strand (S1) designated as antisense.**

## Sequences

<b>S1</b>	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3' (B) 3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	0-22-0
<b>S7</b>	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3' (B) 3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUG -5'	2-19-2
<b>K1</b>	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3' (B) 3'- UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	0-22-0
<b>K3</b>	(A) 5'- GAUGAGGAUCGUUUCGCAUGA -3' (B) 3'- UCCUACUCCUAGCAAAGCGUA -5'	2-19-2
<b>K2</b>	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3' (B) 3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	2-22-2
<b>S1A/ S4B</b>	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3' (B) 3'- CTGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	0-22-2
<b>PKC 1/2</b>	(A) 5'- CUUCUCCGCCUCACACCGCUGCAA -3' (B) 3'- GAAGAGGCGGAGUGUGGCGACG -5'	2-22-0
<b>S7/S12</b>	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3' (B) 3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5'	0-21-0
<b>S7/S11</b>	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3' (B) 3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5'	0-21-2
<b>S4</b>	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUUCUU -3' (B) 3'- CTGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	2-22-2
<b>K1A/ K2B</b>	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3' (B) 3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	0-22-2

<b>K1B/ K2A</b>	(A) 5' - ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3' (B) 3' - UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	2-22-0
<b>S1B/ S4A</b>	(A) 5' - CCACAUGAAGCAGCACGACUUCUU -3' (B) 3' - GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	2-22-0

## Claims

Protection is requested for the following features individually or in combination:

1. Method for inhibition of the expression of a given target gene in a cell, wherein a double-stranded oligoribonucleotide (dsRNA) is introduced into the cell, and one strand (S1) of the dsRNA has a region complementary to the target gene,

characterized in that

the dsRNA is smooth at the 5' end of the one strand (S1) and has a projection of 1 to 4 nucleotides at the 3' end of the one strand (S1).

2. Method per claim 1, wherein the projection is formed by one or two nucleotides.

3. Method per claim 1 or 2, wherein the complementary region of the dsRNA has fewer than 50, preferably fewer than 25, consecutive pairs of nucleotides.

4. Method per one of the preceding claims, wherein the complementary region of the dsRNA has 19 to 24, preferably 19 or 22, consecutive pairs of nucleotides.

5. Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is double-stranded in segments.

6. Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is taken up in a buffer solution for application.

7. Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is administered orally, inhalatory, intratumorally, intravenously or intraperitoneally.

8. Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is enclosed in micelle structures, preferably in liposomes.

9. Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is enclosed in natural viral capsids or in chemically or enzymatically produced synthetic capsids or structures derived from them.

10. Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is administered intravenously or intraperitoneally by means of injection or infusion.

11. Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is administered in a quantity of not more than 5 mg per kilogram of body weight per day.

12. Method per one of the preceding claims, wherein the target gene is expressed in eukaryotic cells.

13. Method per one of the preceding claims, wherein the target gene is chosen from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-protein gene, development gene, prion gene.

14. Method per one of the preceding claims, wherein the target gene is expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.

15. Method per one of the preceding claims, wherein the target gene is a component of a virus or viroid.

16. Method per one of the preceding claims, wherein the virus is a human pathogenic virus or viroid.

17. Method per one of the preceding claims, wherein the ends of the dsRNA are modified to counteract a breakdown in the cell or a dissociation into single strands.

18. Method per one of the preceding claims, wherein the cohesion of the double-stranded structure brought about by the complementary nucleotide pairs is enhanced by at least one, preferably two additional chemical bonds.

19. Method per one of the preceding claims, wherein the chemical bonding is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bridge bond, hydrophobic interactions, preferably van der Waals or stacking interactions, or by metal ion coordination.

20. Method per one of the preceding claims, wherein the chemical bond is formed by purine analogues used in place of purines in the double-stranded structure.

21. Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is bound to, associated with, or encased in a viral envelope protein coming from a virus, derived therefrom, or synthetically produced.

22. Method per one of the preceding claims, wherein the envelope protein is derived from the Polyoma virus.

23. Method per one of the preceding claims, wherein the envelope protein contains the virus protein 1 (VP1) and/or the virus protein 2 (VP2) of the Polyoma virus.

24. Method per one of the preceding claims, wherein upon forming a capsid or capsid-like structure from the envelope protein, one side is turned toward the interior of the capsid or capsid-like structure.

25. Method per one of the preceding claims, wherein the cell is a vertebrate cell or a human cell.

26. Medicament for inhibition of the expression of a given target gene in a cell, containing at least one double-stranded oligoribonucleotide (dsRNA), wherein one strand (S1) of the dsRNA has a region complementary to the target gene,

characterized in that

the dsRNA is smooth at the 5' end of the one strand (S1) and has a projection of 1 to 4 nucleotides at the 3' end of the one strand (S1).

27. Medicament per claim 26, wherein the projection is formed by one or two nucleotides.

28. Medicament per claim 26 or 27, wherein the complementary region of the dsRNA has fewer than 50, preferably fewer than 25, consecutive pairs of nucleotides.

29. Medicament per one of claims 26 to 28, wherein the complementary region of the dsRNA has 19 to 24, preferably 19 or 22, consecutive pairs of nucleotides.

30. Medicament per one of claims 26 to 29, wherein the dsRNA is double-stranded in segments.

31. Medicament per one of claims 26 to 30, wherein the dsRNA is taken up in a buffer solution for application.

32. Medicament per one of claims 26 to 31, wherein the dsRNA is administered orally, inhalatory, intratumorally, intravenously or intraperitoneally.

33. Medicament per one of claims 26 to 32, wherein the dsRNA is enclosed in micelle structures, preferably in liposomes.

34. Medicament per one of claims 26 to 33, wherein the dsRNA is enclosed in natural viral capsids or in chemically or enzymatically produced synthetic capsids or structures derived from them.

35. Medicament per one of claims 26 to 34, wherein the dsRNA is administered intravenously or intraperitoneally by means of injection or infusion.
36. Medicament per one of claims 26 to 35, wherein the dsRNA is administered in a quantity of not more than 5 mg per kilogram of body weight per day.
37. Medicament per one of claims 26 to 36, wherein the target gene is expressed in eukaryotic cells.
38. Medicament per one of claims 26 to 37, wherein the target gene is chosen from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-protein gene, development gene, prion gene.
39. Medicament per one of claims 26 to 38, wherein the target gene is expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.
40. Medicament per one of claims 26 to 39, wherein the target gene is a component of a virus or viroid.
41. Medicament per one of claims 26 to 40, wherein the virus is a human pathogenic virus or viroid.
42. Medicament per one of claims 26 to 41, wherein the ends of the dsRNA are modified to counteract a breakdown in the cell or a dissociation into single strands.
43. Medicament per one of claims 26 to 42, wherein the cohesion of the double-stranded structure brought about by the complementary nucleotide pairs is enhanced by at least one, preferably two additional chemical bonds.
44. Medicament per one of claims 26 to 43, wherein the chemical bonding is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bridge bond, hydrophobic interactions, preferably van der Waals or stacking interactions, or by metal ion coordination.
45. Medicament per one of claims 26 to 44, wherein the chemical bond is formed by purine analogues used in place of purines in the double-stranded structure.
46. Medicament per one of claims 26 to 45, wherein the dsRNA is bound to, associated with, or encased in a viral envelope protein coming from a virus, derived therefrom, or synthetically produced.
47. Medicament per one of claims 26 to 46, wherein the envelope protein is derived from the Polyoma virus.
48. Medicament per one of claims 26 to 47, wherein the envelope protein contains the virus protein 1 (VP1) and/or the virus protein 2 (VP2) of the Polyoma virus.
49. Medicament per one of claims 26 to 48, wherein upon forming a capsid or capsid-like structure from the envelope protein, one side is turned toward the interior of the capsid or capsid-like structure.
50. Medicament per one of claims 26 to 49, wherein the cell is a vertebrate cell or a human cell.
51. Use of a double-stranded oligoribonucleotide (dsRNA), wherein one strand (S1) of the dsRNA has a region complementary to the target gene, the dsRNA is smooth at the 5' end of the one strand (S1) and has a projection of 1 to 4 nucleotides at the 3' end of the one strand (S1), for inhibition of the expression of the target gene in a cell
52. Use per claim 51, wherein the projection is formed by one or two nucleotides.
53. Use per claim 51 or 52, wherein the complementary region of the dsRNA has fewer than 50, preferably fewer than 25, consecutive pairs of nucleotides.



54. Use per one of claims 51 to 53, wherein the complementary region of the dsRNA has 19 to 24, preferably 19 or 22, consecutive pairs of nucleotides.
55. Use per one of claims 51 to 54, wherein the dsRNA is double-stranded in segments.
56. Use per one of claims 51 to 55, wherein the dsRNA is taken up in a buffer solution for application.
57. Use per one of claims 51 to 56, wherein the dsRNA is administered orally, inhalatory, intratumorally, intravenously or intraperitoneally.
58. Use per one of claims 51 to 57, wherein the dsRNA is enclosed in micelle structures, preferably in liposomes.
59. Use per one of claims 51 to 58, wherein the dsRNA is enclosed in natural viral capsids or in chemically or enzymatically produced synthetic capsids or structures derived from them.
60. Use per one of claims 51 to 59, wherein the dsRNA is administered intravenously or intraperitoneally by means of injection or infusion.
61. Use per one of claims 51 to 60, wherein the dsRNA is administered in a quantity of not more than 5 mg per kilogram of body weight per day.
62. Use per one of claims 51 to 61, wherein the target gene is expressed in eukaryotic cells.
63. Use per one of claims 51 to 62, wherein the target gene is chosen from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-protein gene, development gene, prion gene.
64. Use per one of claims 51 to 63, wherein the target gene is expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.
65. Use per one of claims 51 to 64, wherein the target gene is a component of a virus or viroid.
66. Use per one of claims 51 to 65, wherein the virus is a human pathogenic virus or viroid.
67. Use per one of claims 51 to 66, wherein the ends of the dsRNA are modified to counteract a breakdown in the cell or a dissociation into single strands.
68. Use per one of claims 51 to 67, wherein the cohesion of the double-stranded structure brought about by the complementary nucleotide pairs is enhanced by at least one, preferably two additional chemical bonds.
69. Use per one of claims 51 to 68, wherein the chemical bonding is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bridge bond, hydrophobic interactions, preferably van der Waals or stacking interactions, or by metal ion coordination.
70. Use per one of claims 51 to 69, wherein the chemical bond is formed by purine analogues used in place of purines in the double-stranded structure.
71. Use per one of claims 51 to 70, wherein the dsRNA is bound to, associated with, or encased in a viral envelope protein coming from a virus, derived therefrom, or synthetically produced.
72. Use per one of claims 51 to 71, wherein the envelope protein is derived from the Polyoma virus.
73. Use per one of claims 51 to 72, wherein the envelope protein contains the virus protein 1 (VP1) and/or the virus protein 2 (VP2) of the Polyoma virus.

74. Use per one of claims 51 to 73, wherein upon forming a capsid or capsid-like structure from the envelope protein, one side is turned toward the interior of the capsid or capsid-like structure.

75. Use per one of claims 51 to 74, wherein the cell is a vertebrate cell or a human cell.

For an explanation of the aforementioned features, reference is made in particular to WO00/44895, whose disclosure content is hereby incorporated in its entirety.

Fig. 1

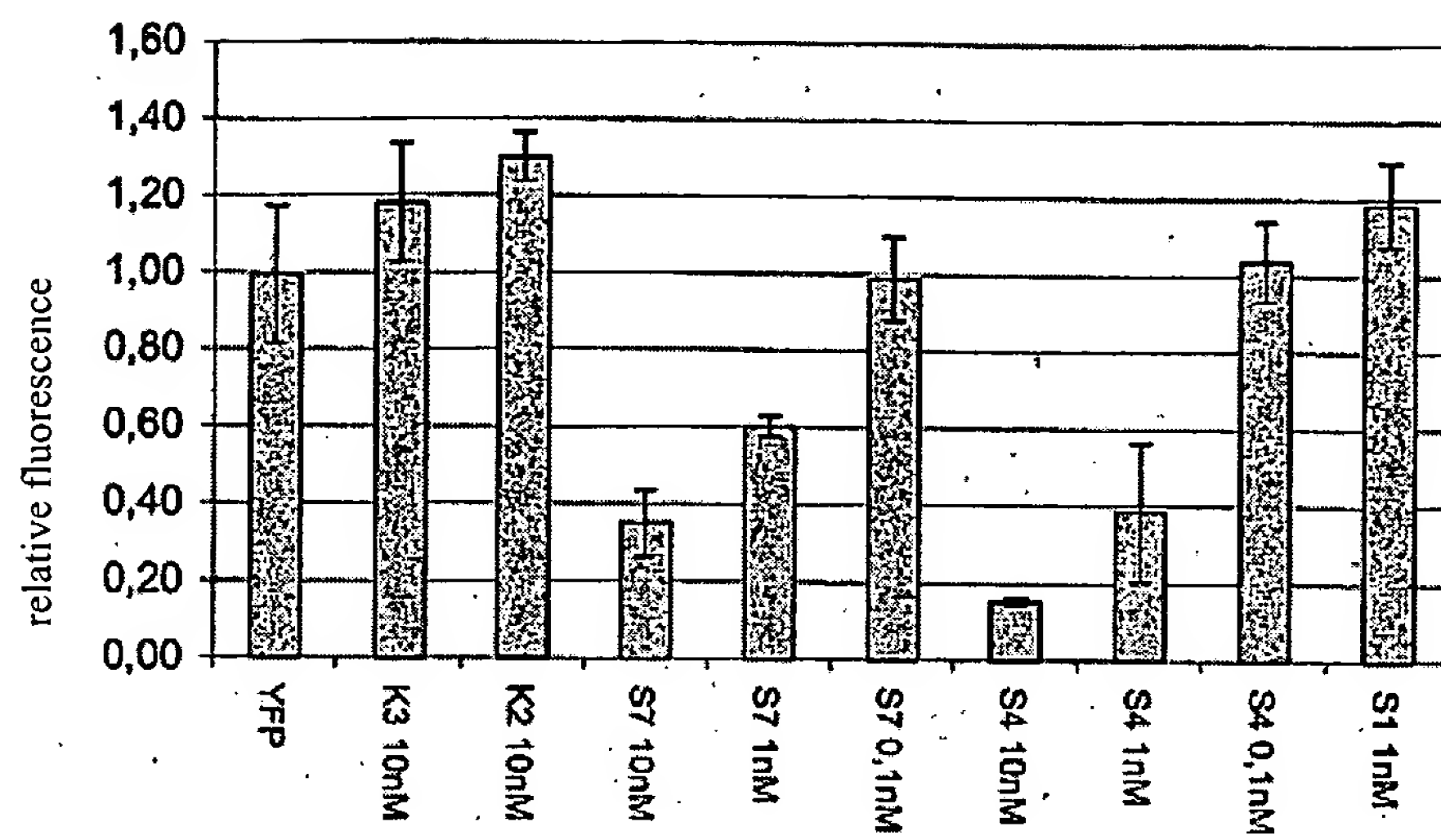


Fig. 2

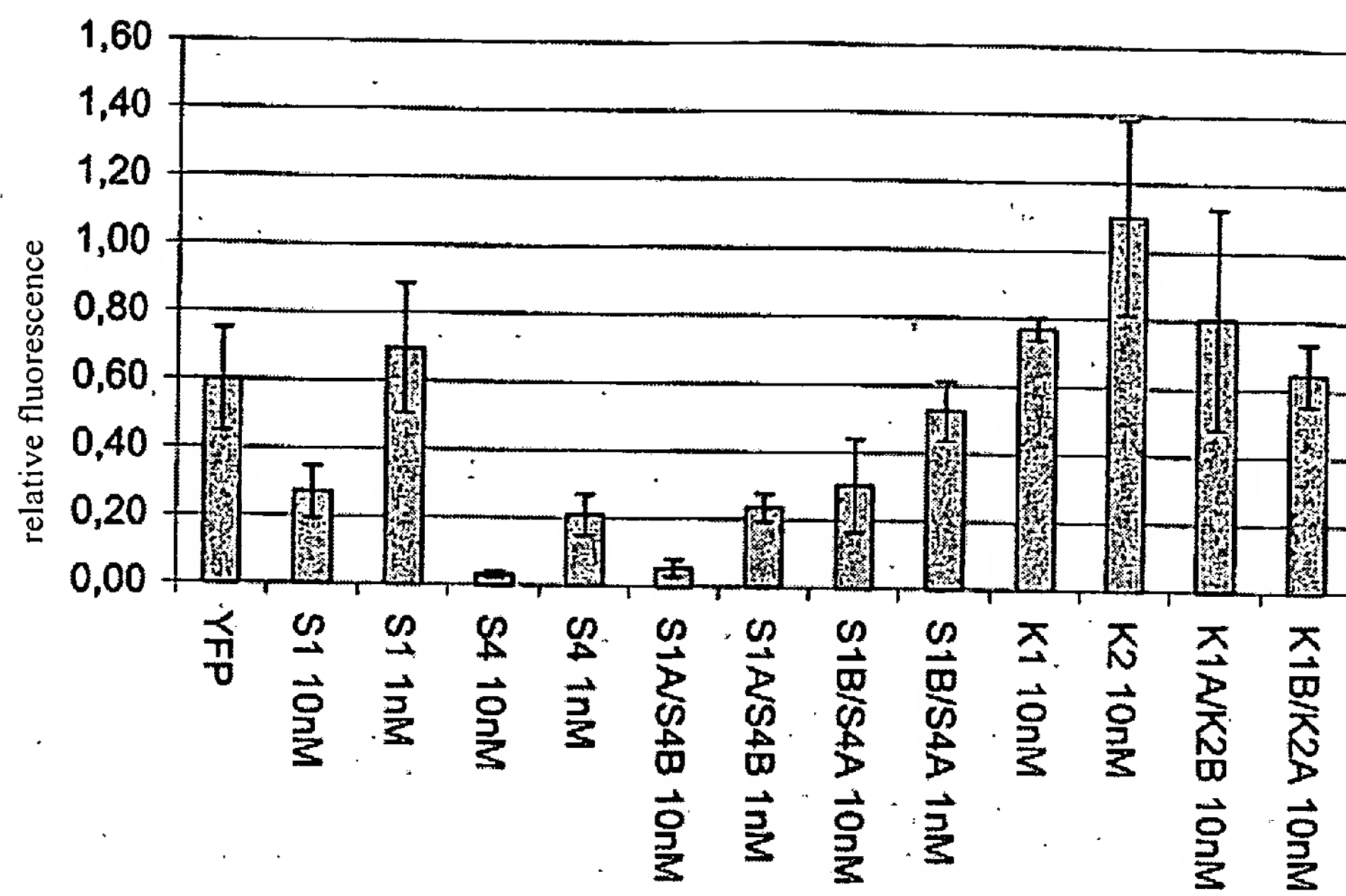


Fig. 3

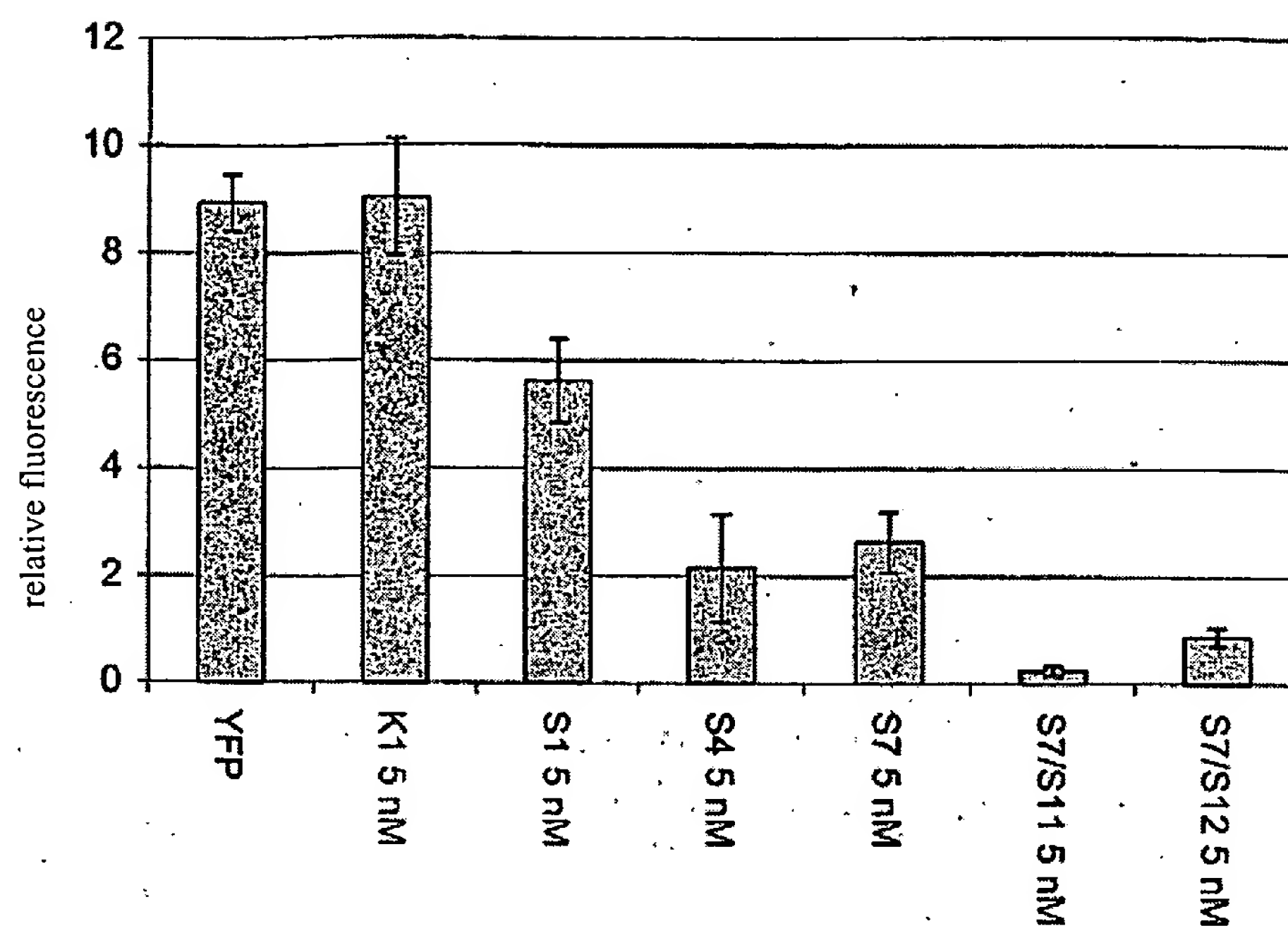


Fig. 4

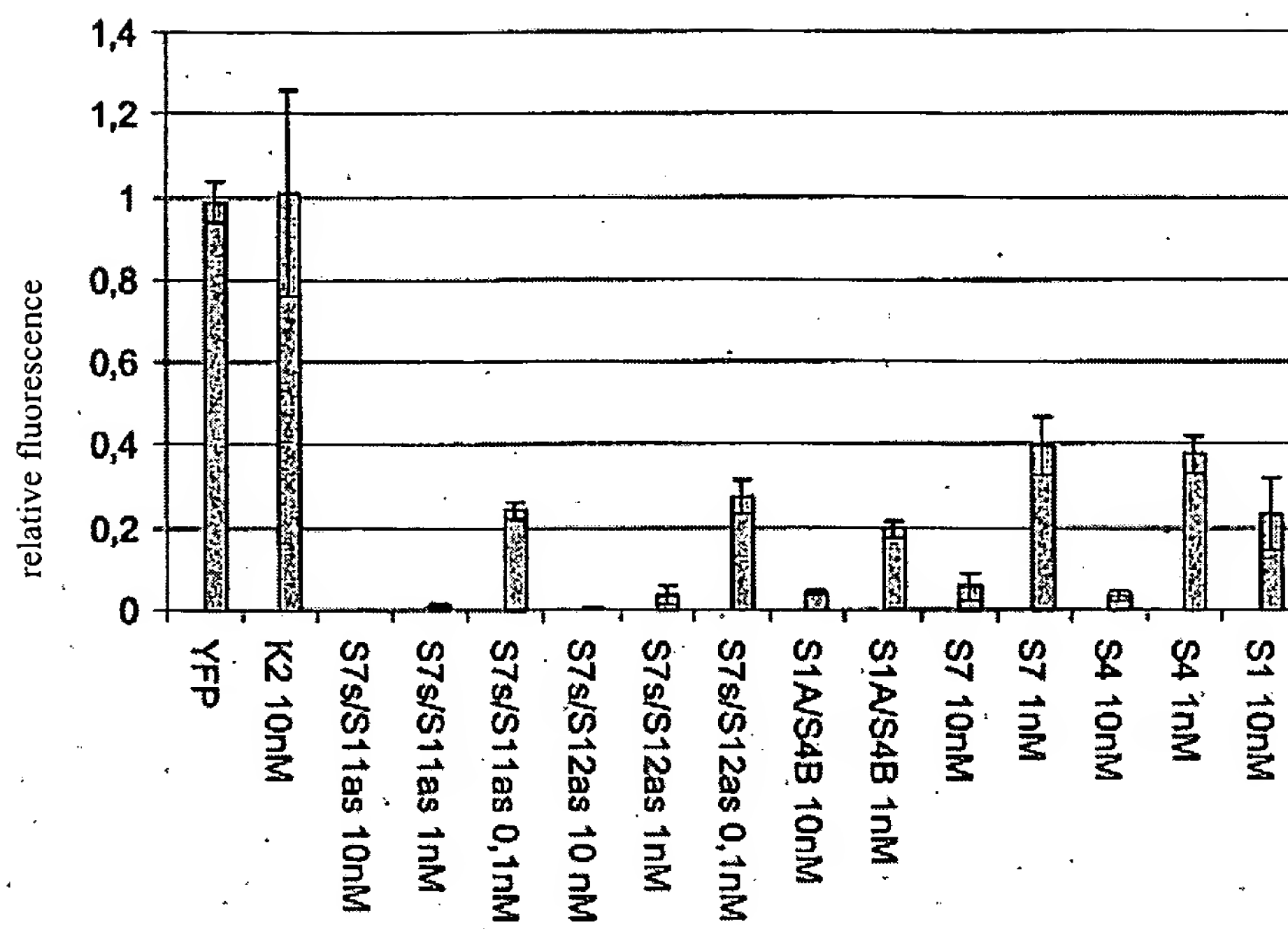




Fig. 5

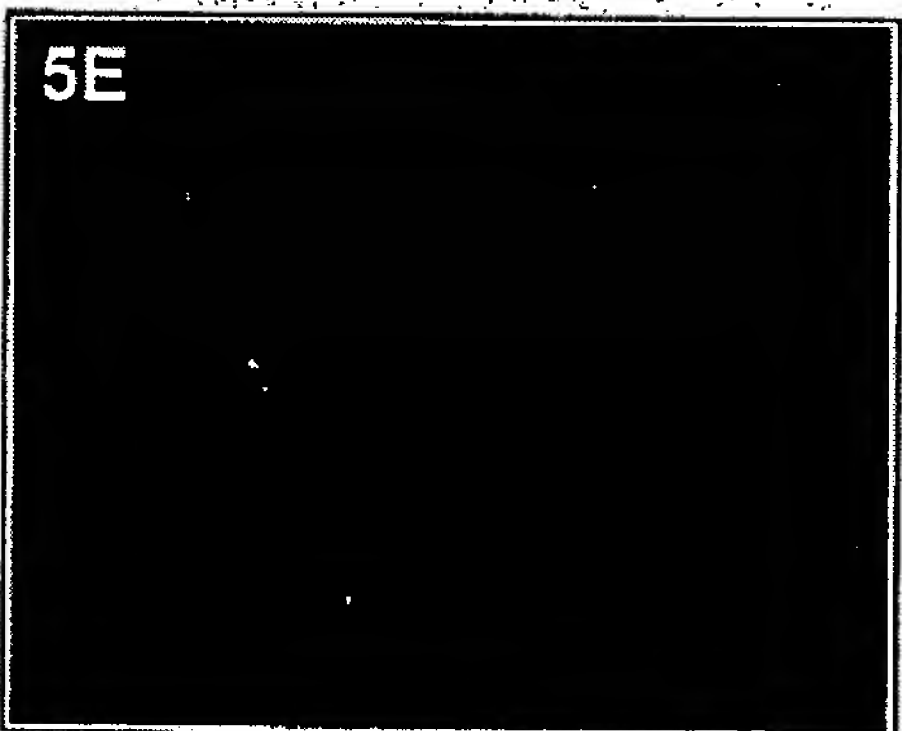
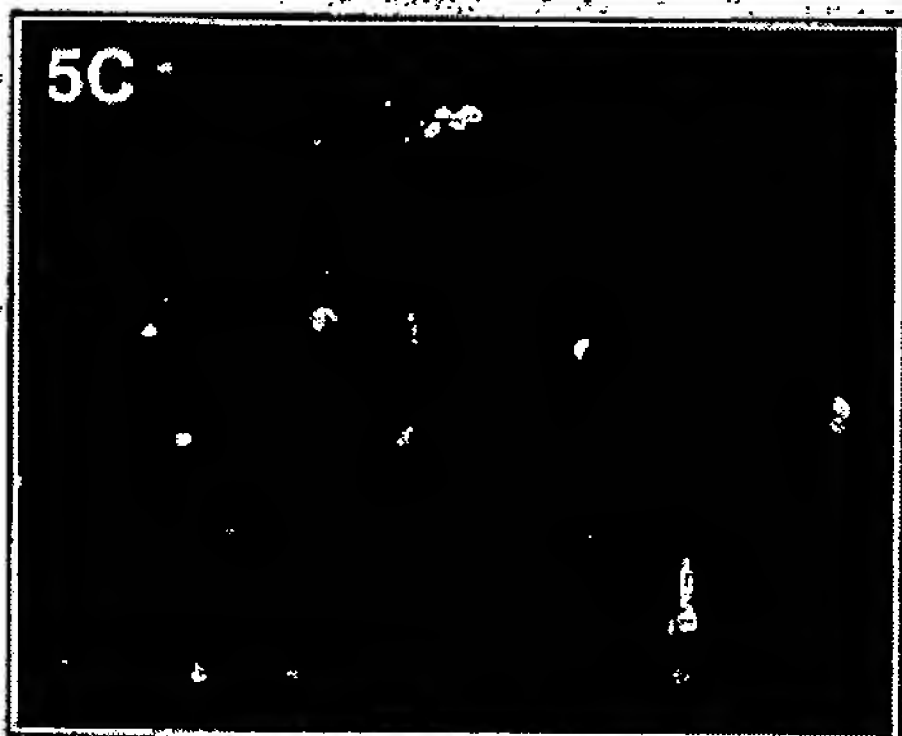
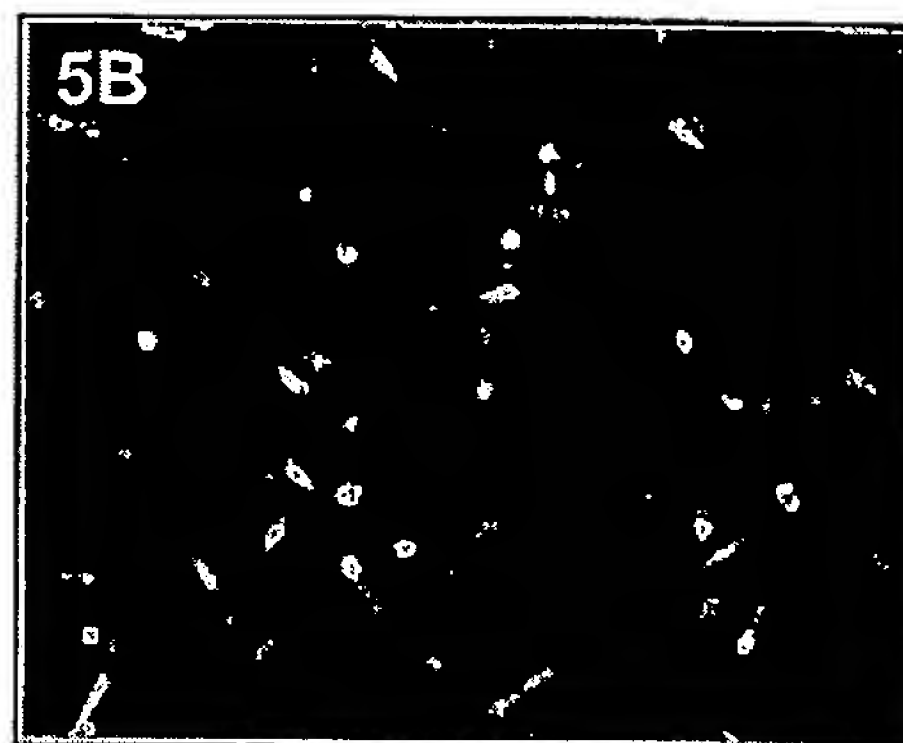
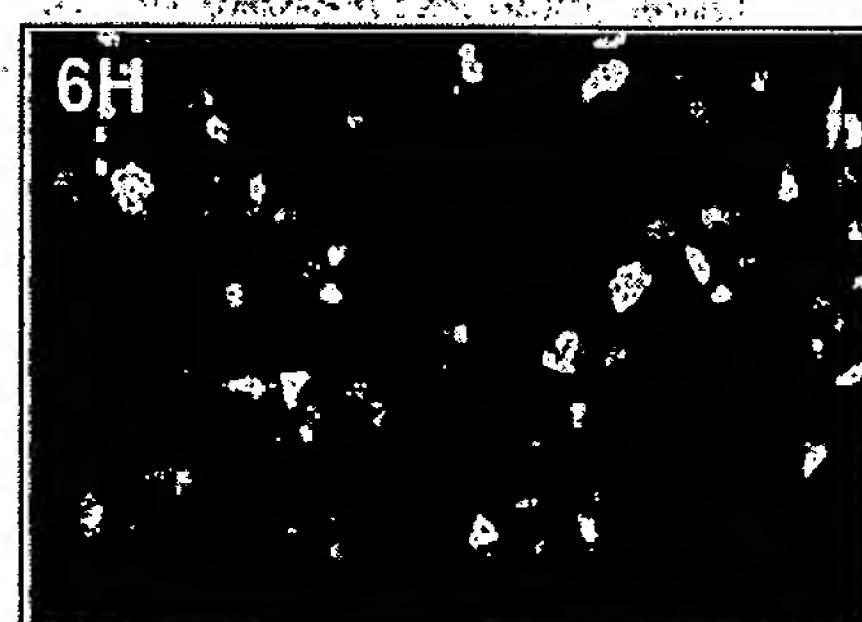
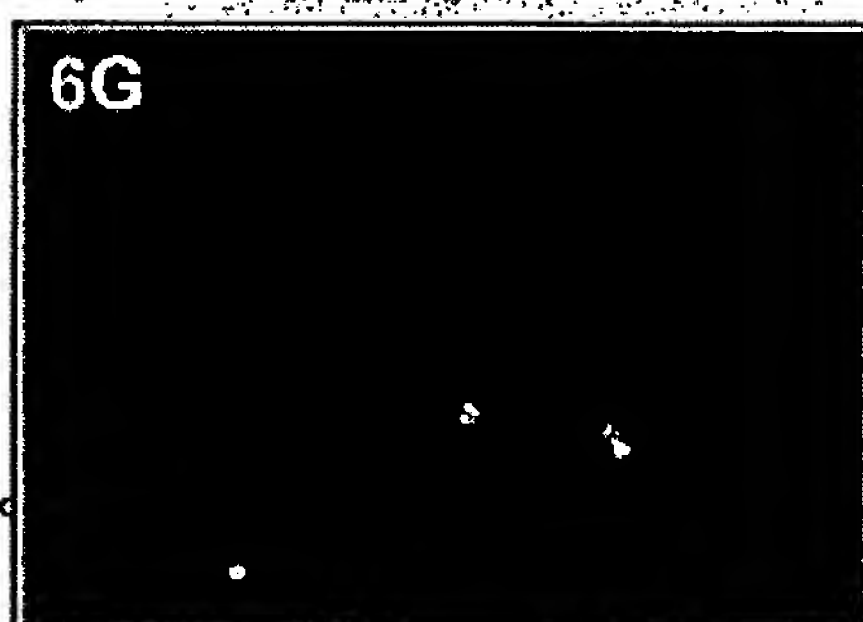
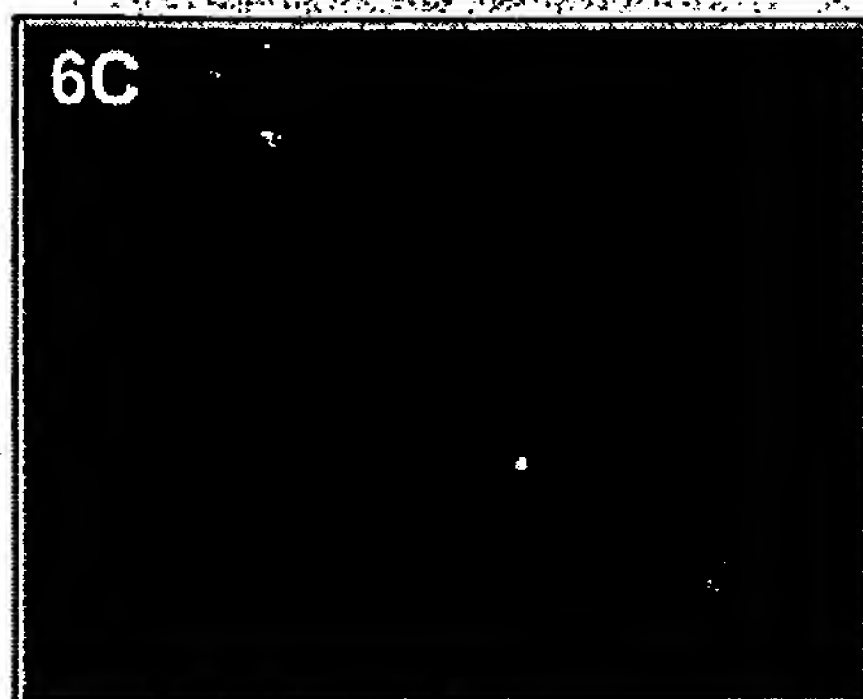
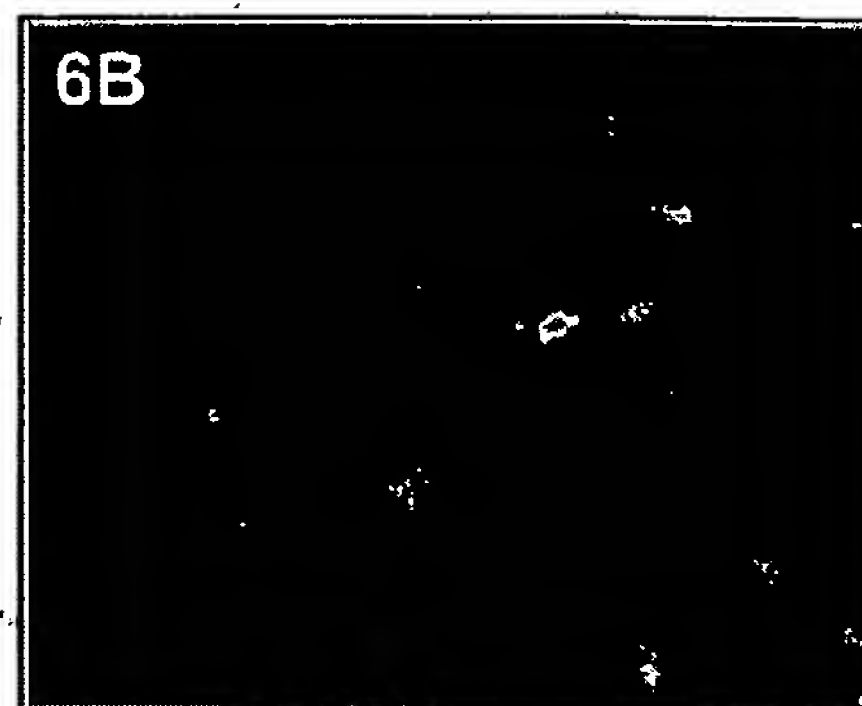
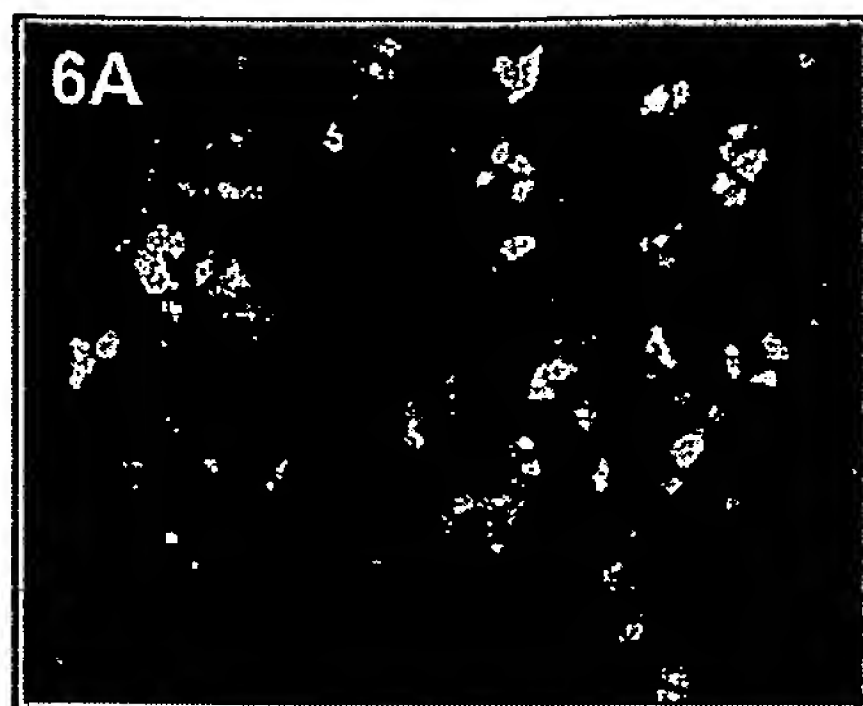


Fig. 6



D

Fig. 7

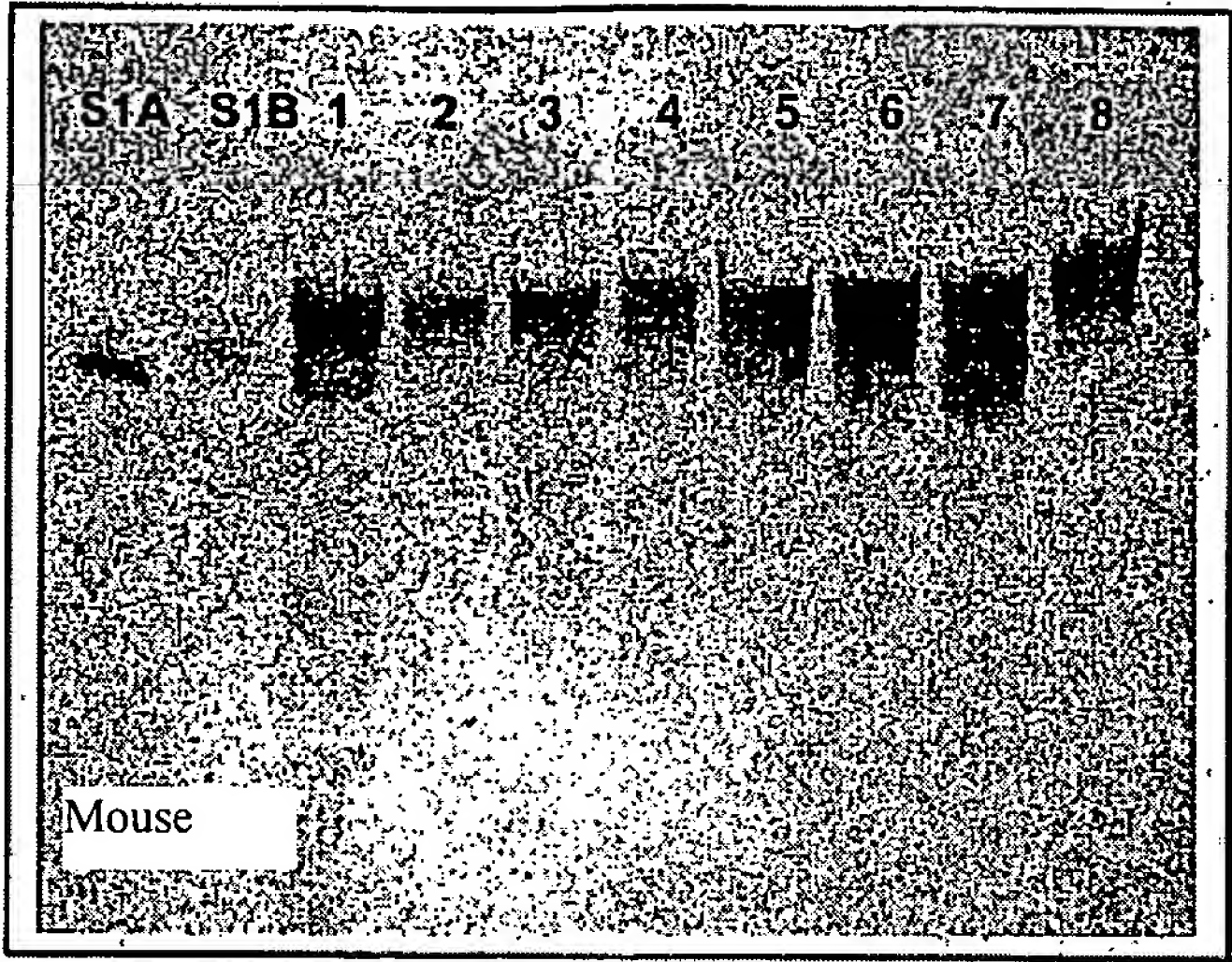


Fig. 8

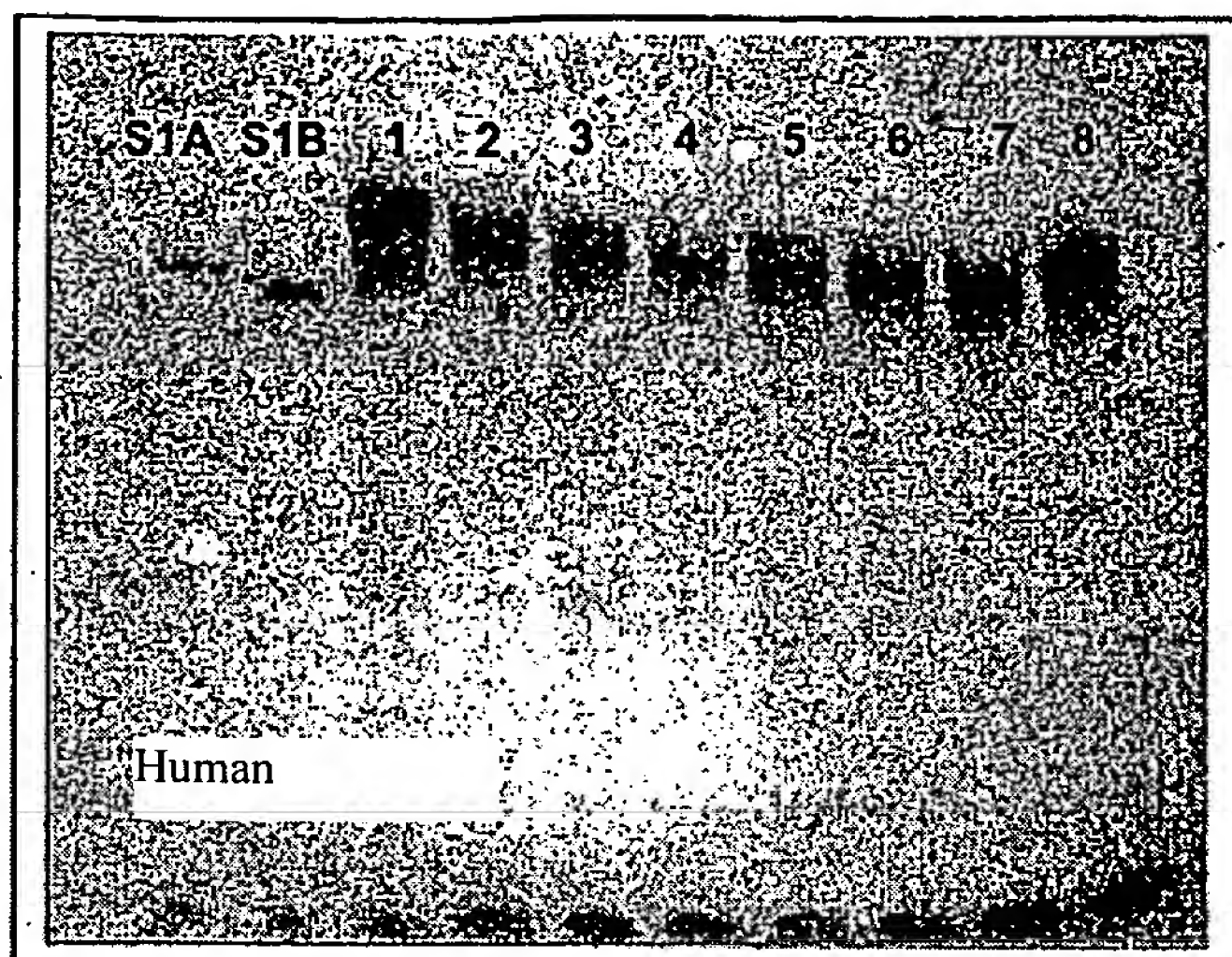


Fig. 9

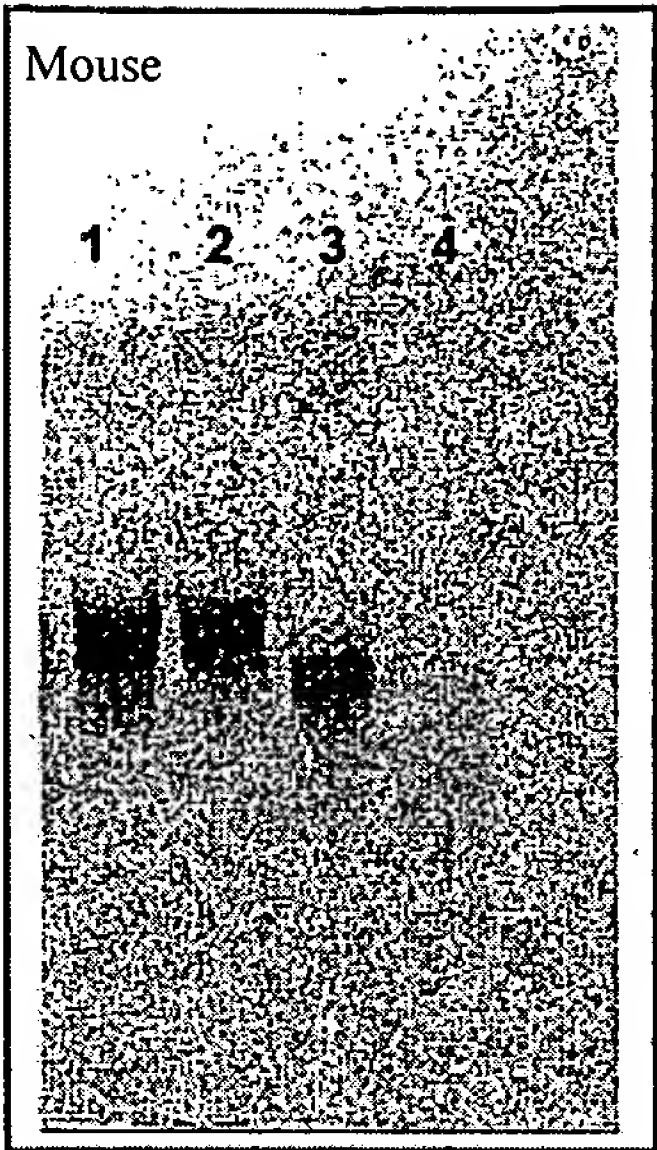


Fig. 10

**S7**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

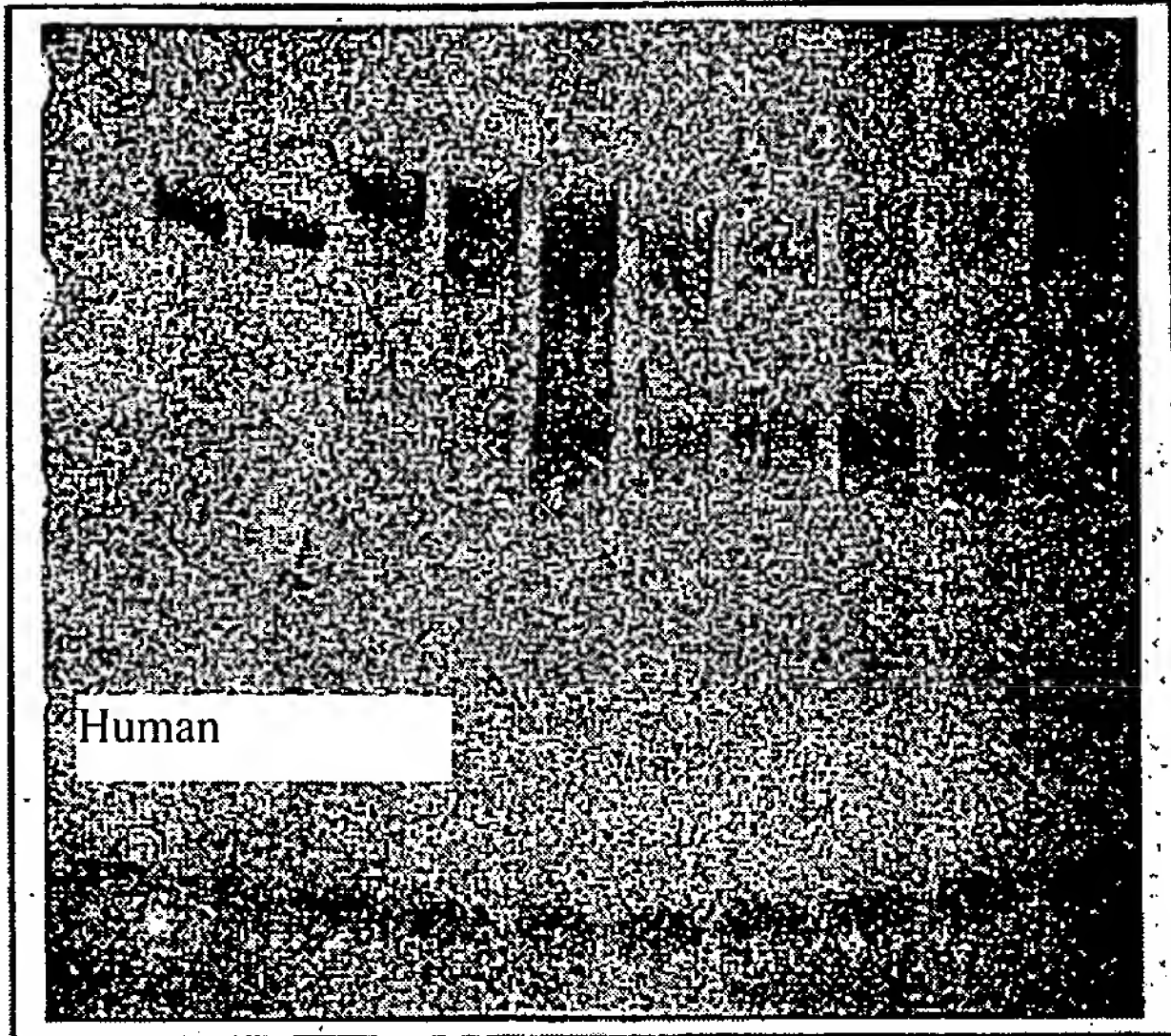




Fig. 11

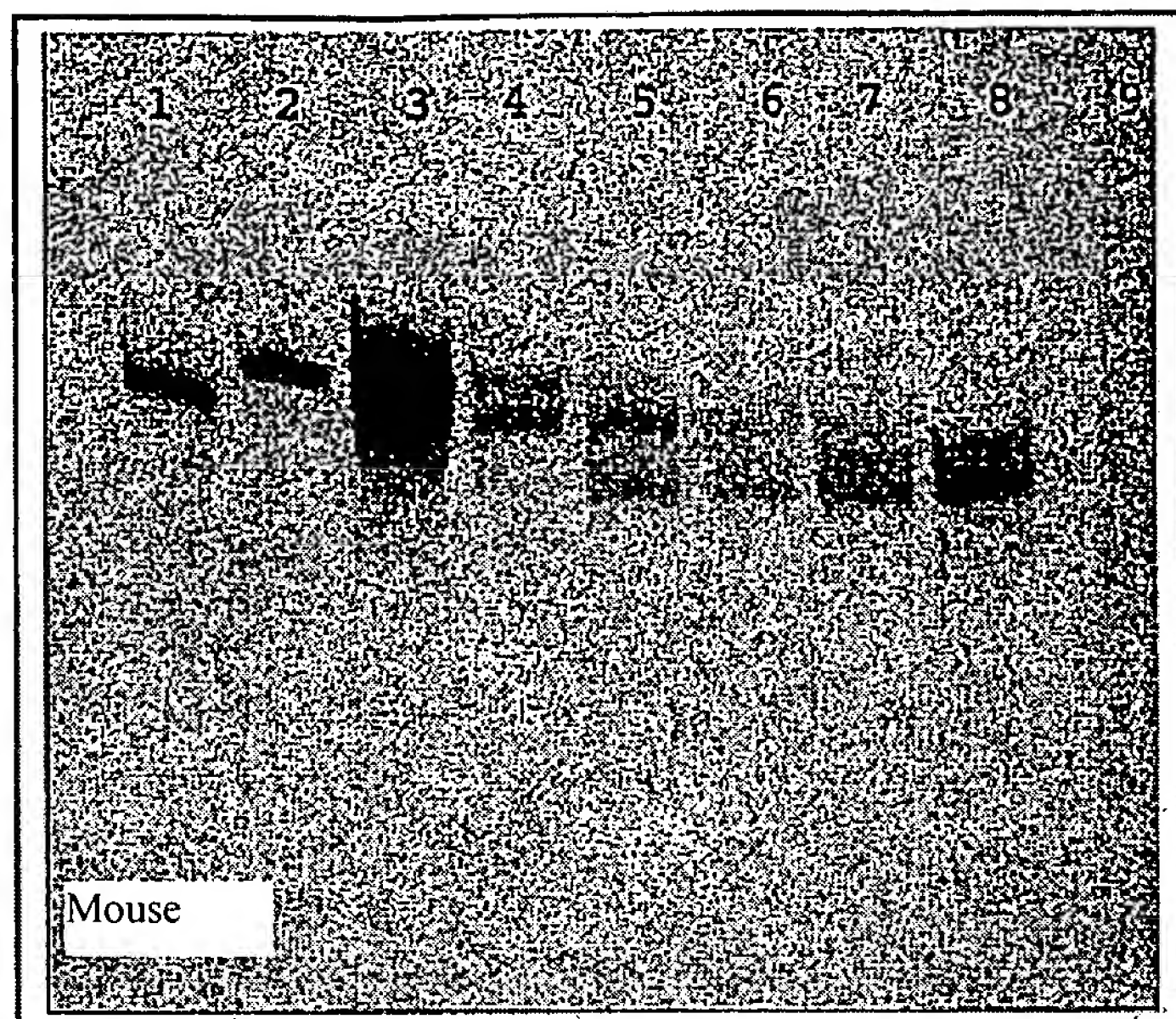


Fig. 12

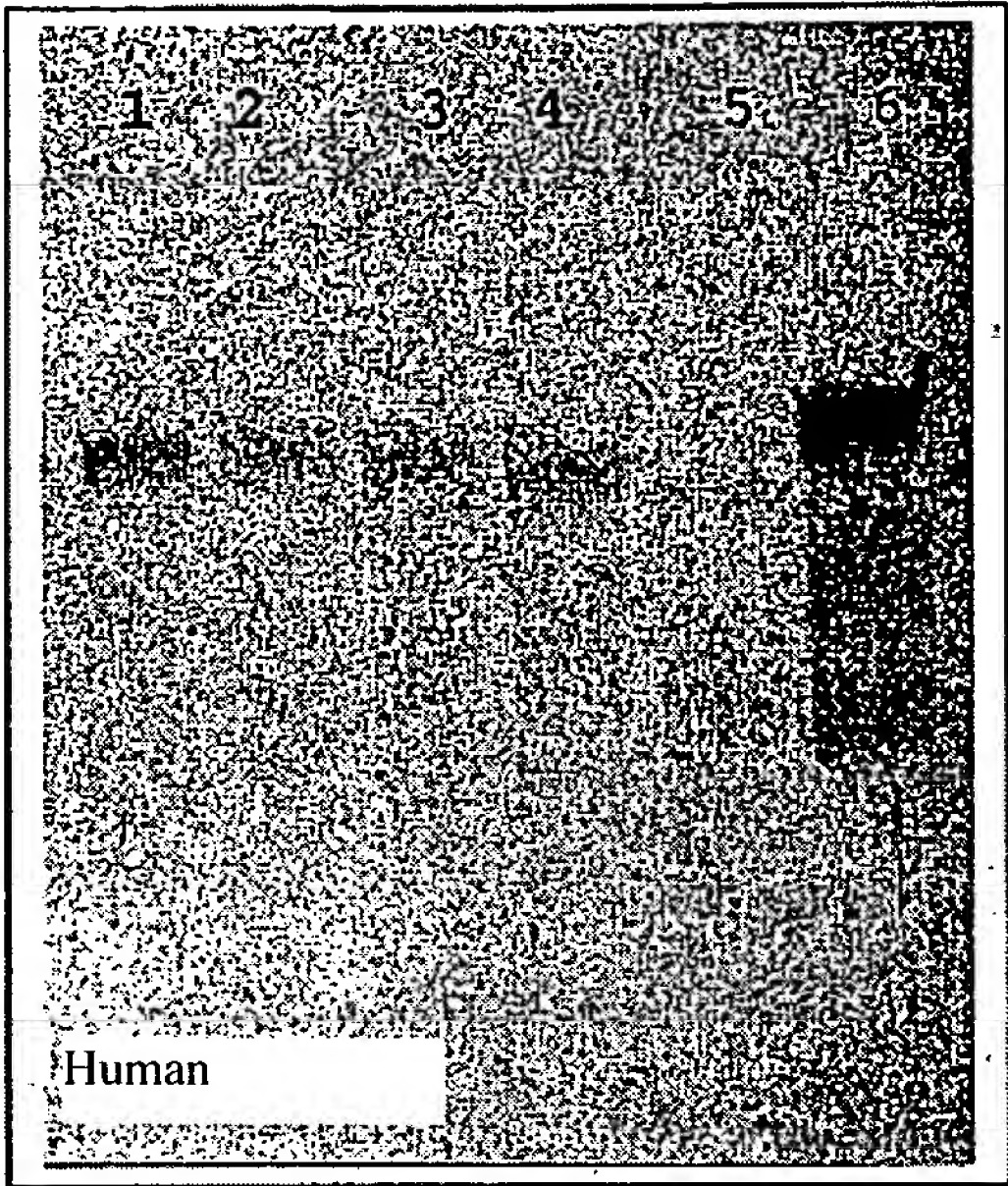


Fig. 13

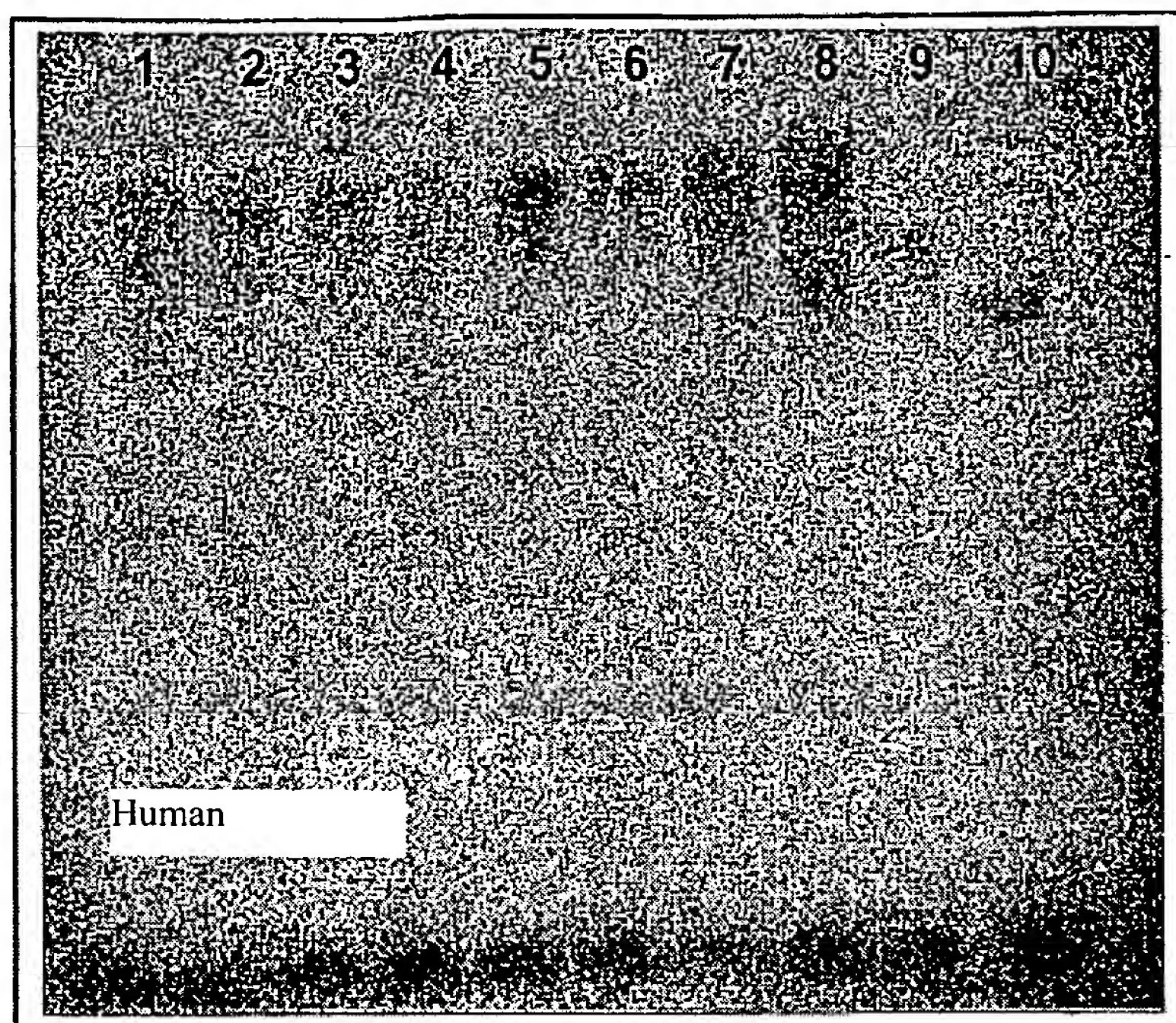
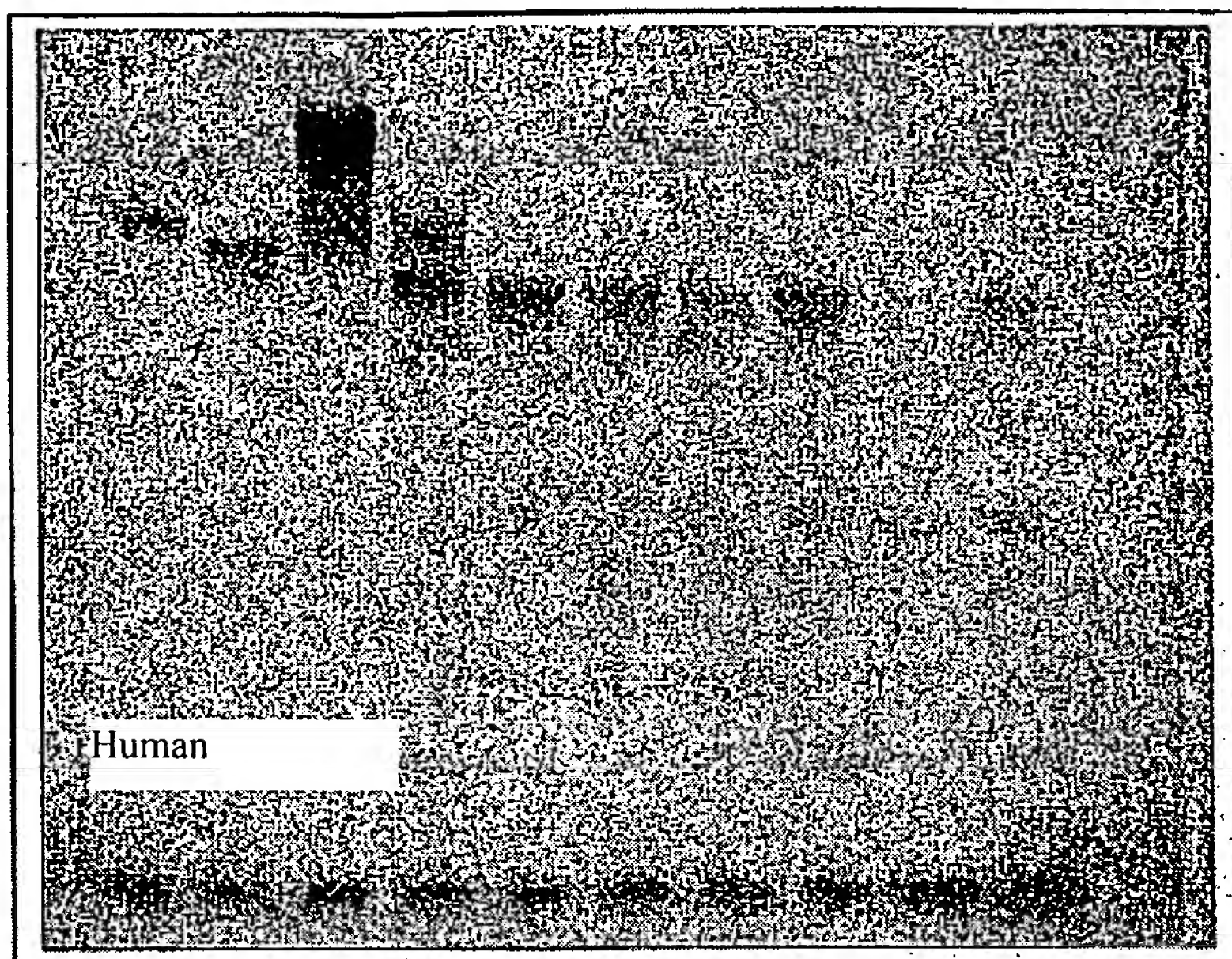


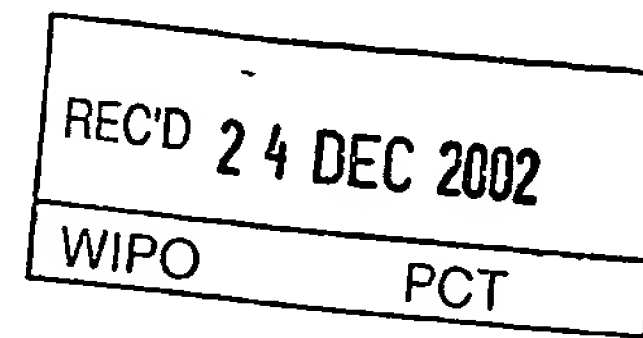


Fig. 14

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 101 60 151.4

**Anmeldetag:** 07. Dezember 2001

**Anmelder/Inhaber:** Ribopharma AG,  
Bayreuth/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Hemmung der Expression eines  
vorgegebenen Zielgens in einer Zelle

**IPC:** C 12 N 15/63

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 05. Dezember 2002  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Dzierzon

Verfahren zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, wie es z.B. aus der  
5 WO00/44895 bekannt ist.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren, Medikament, eine  
Verwendung verbesserter Wirksamkeit zur Hemmung der Expression  
eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle anzugeben. Insbe-  
10 sondere sollen das Verfahren, Medikament und die Verwendung in  
vivo anwendbar sein.

Diese Aufgabe wird durch die im Anspruchskomplex wiedergeben-  
den Merkmale gelöst.

15

Das Verfahren ermöglicht vorteilhafterweise eine besonders ef-  
fektive Hemmung der Expression eines Zielgens in vivo. Die er-  
findungsgemäß beanspruchte dsRNA zeichnet sich durch eine gute  
Wirksamkeit bei gleichzeitig hoher Serumstabilität aus. Die  
20 dsRNA kann überraschenderweise aufgenommen in einer geeigneten  
Lösung, z.B. intravenös, appliziert werden. Es ist nicht er-  
forderlich besondere Maßnahmen zu treffen, um die dsRNA in die  
Zelle einzuschleusen.

25 Ausführungsbeispiele:

#### In vivo-Studie - Ausführungsbeispiel

Es wurde „GFP-Labormäuse“, welche das Grün-fluoreszierende  
30 Protein (GFP) in allen Proteinbiosynthese betreibenden Zellen  
exprimieren, doppelsträngige RNA (dsRNA), die aus der GFP-  
Sequenz abgeleitet wurde, i.v. injiziert. Am Versuchsende wur-  
den die Tiere getötet und die GFP-Expression in Nierenschnitt-



ten und im Serum gegenüber Tieren, die dsRNAs erhielten, die nicht aus der GFP-Sequenz abgeleitet war, untersucht.

## Versuchsprotokoll

### 5 Synthese der dsRNA

#### Versuchstierhaltung und Versuchsdurchführung

Es wurde der transgene Labormausstamm TgN(GFPU)5Nagy (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) verwendet, der GFP (mit einem beta-Aktin-Promotor und einem CMV intermediate early enhancer) in allen bisher untersuchten Zellen exprimiert (Hadjantonakis AK et al., 1993, Mech. Dev 76: 79-90). GFP-transgene Mäuse lassen sich eindeutig anhand der Fluoreszenz (mit einer UV-Handlampe) von den entsprechenden Wildtypen (WT) unterscheiden. Für die Zucht wurde jeweils der entsprechende WT mit einem heterozygotem GFP-Typ verpaart.

Die Untersuchung erfolgte gemäß den deutschen Tierschutzbestimmungen. Die Tiere wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen in Gruppen von 3-5 Tieren in Typ III Makrolon-Käfigen der Fa. Ehret, Emmendingen, bei einer konstanten Temperatur von 20°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12h gehalten. Als Sägemehleinstreu wurde Weichholzgranulat 8/15 der Fa. Altromin, Lage, verwendet. Die Tiere erhielten Leitungswasser und Standardfutter Altromin 1324 pelletiert (Altromin) ad libidum.

25

Für die Versuchsdurchführung wurden die heterozygoten GFP-Tiere zu je 3 Tieren gruppenweise in Käfigen gehalten. Die Injektionen erfolgten i.v. in die Schwanzvene im 12h-Turnus über 5 Tage hinweg. Das Injektionsvolumen betrug 60 µl pro 10 g Tier und die Dosis betrug 2.5 mg dsRNA bzw. 50 µg pro kg Tier. Die Einteilung in die Gruppen war wie folgt: Gruppe A bestand aus 6 Tieren und erhielt PBS (phosphate buffered saline),

Gruppe B, 2 Tiere, erhielt 2.5 mg einer Kontroll-dsRNA (S1-Kontrolle) pro kg, Gruppe C, 6 Tiere, erhielt 2.5 mg einer weiteren Kontroll-dsRNA (S7-Kontrolle) pro kg, Gruppe D, 6 Tiere, erhielt 2.5 mg dsRNA (GFP-spezifisch, im weiteren als S1 bezeichnet) pro kg, Gruppe E, 6 Tiere, erhielt 2.5 mg dsRNA (GFP-spezifisch, im weiteren als S7 bezeichnet) pro kg und Gruppe F, 6 Tiere, erhielt 50 µg S1-dsRNA pro kg. Nach der letzten Injektion wurden die Tiere im zeitlichen Abstand von 14-20h getötet, Organe und Blut entnommen.

10

#### Organentnahme

Sofort nach dem Töten der Tiere wurden Blut und verschiedene Organe entnommen (Thymus, Lunge, Herz, Milz, Magen, Darm, Pankreas, Gehirn, Niere und Leber). Die Organe wurden kurz in kaltem, sterilem PBS gespült und mit einem sterilem Skalpell zerteilt. Ein Teil wurde für immunhistochemische Färbungen in Methyl Carnoys (MC, 60% Methanol, 30% Chloroform, 10% Essigsig) für 24h fixiert, ein Teil für Gefrierschnitte und für Proteinisolierungen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert und ein weiterer, kleinerer Teil wurde für RNA-Isolierungen in RNAeasy-Protect (Qiagen) bei -80°C eingefroren. Das Blut wurde sofort nach der Entnahme auf Eis gehalten, 5 min bei 2000 rpm (Mini spin, Eppendorf) zentrifugiert, Serum abgenommen und bei -80°C gelagert.

25

#### Prozessieren der Biopsien

Nach 24h Fixierung in MC wurden die Biopsien in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei RT dehydriert: je 490 min 70% Methanol, 80% Methanol, 2 x 96% Methanol und 3 x 100% Isopropanol. Danach wurden die Gewebe in 100% Isopropanol auf 60°C im Brutschrank erwärmt, nachfolgend für 1h in einem Isopropanol/Paraffin-Gemisch bei 60°C und 3 x für 2h in Paraffin inkubiert und sodann in Paraffin eingebettet. Für Immunperoxidase-

Färbungen wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leika) Gewebeschnitte von 3  $\mu$ m Schnittdicke angefertigt, auf Objektträger (Superfrost, Vogel) aufgezogen und für 30 min bei 60°C im Brutschrank inkubiert.

5

#### Immunperoxidase-Färbung gegen GFP

- Die Schnitte wurden 3 x 5 min in Xylol deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (3 x 3 min 100% Ethanol, 2 x 2 min 95% Ethanol) rehydriert und danach 20 min in 3%  $H_2O_2$ /Methanol zum Blocken endogener Peroxidasen inkubiert. Nach 3 x 3 min Waschen mit PBS wurde mit dem 1. Antikörper (goat-polyklonaler anti-GFP, Santa Cruz Biotechnology) 1:500 mit 1% BSA/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper (1:2000 Verdünnung) erfolgte für 30 min bei RT, danach wurde für 30 min mit Avidin D Peroxidase (1:2000-Verdünnung, Vector Laboratories) inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Schnitte 3 x 3 min in PBS gewaschen. Alle Antikörper wurden in 1% Rinder-serumalbumin (BSA) verdünnt. Die Färbung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde mit dem DAB Substrat Kit (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als nukleäre Gegenfärbung wurde Hämatoxylin III nach Gill (Merck) verwendet. Nach der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und 3 x 5 min Xylol wurden die Schnitte mit Entellan (Merck) eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung der Färbung erfolgte IX50 Mikroskop von Olympus, ausgestattet mit einer CCD-Camera (Hamamatsu).

#### SDS-Gelelektrophorese zur Auftrennung der Serumproteine

- Die elektrophoretische Auftrennung der Serumproteine erfolgte in einer Multigel-Long Elektrophoresekammer von Biometra mit einer denaturierenden, diskontinuierlichen 15% SDS-PAGE (Polyakrylamid Gelelektrophorese) nach Lämmli (Nature 277: 680-

685, 19970). Dazu wurde zunächst ein Trenngel mit 1.5 mm Dicke gegossen: 7.5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 0.9%), 3.8 ml 1.M Tris/HCl, pH 8.4, 150  $\mu$ l 10% SDS, 3.3 ml Aqua bidest., 250 ml Ammoniumpersulfat (10%), 9  $\mu$ l TEMED (N,N,N',N'-Tertamethylendiamin) und bis zum Auspolymerisieren mit 0.1% SDS überschichtet. Danach wurde das Sammelgel gegossen: 0.83 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0.9%), 630 ml 1 M Tris/HCl, pH 6.8, 3.4 ml Aqua bidest., 50  $\mu$ l 10% SDS, 50  $\mu$ l 10% Ammoniumpersulfat, 5  $\mu$ l TEMED.

10

Vor dem Auftrag auf das Gel wurden je 3  $\mu$ l Serum mit 6  $\mu$ l Aqua bidest. und 3  $\mu$ l 4fach Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6.8, 4% SDS, 100 mM DTT (Dithiotreitol), 0.02% Bromphenolblau, 20% Glycerin) versetzt, für 5 min im Heizblock bei 100°C denaturiert, nach dem Abkühlen auf Eis kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte wassergekühlt bei RT und konstant 50 V. Als Längenstandard wurde der Proteingelmarker verwendet.

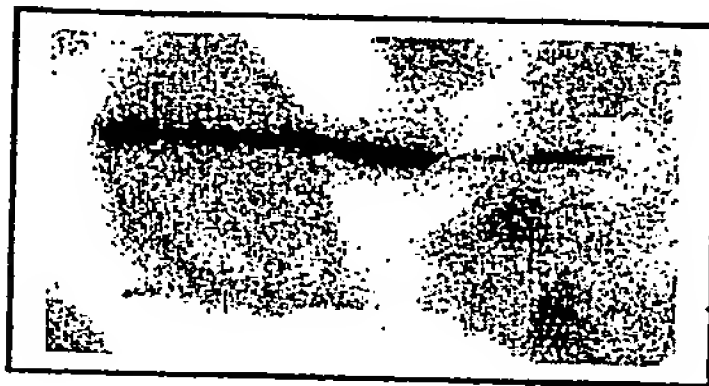
## 20 Western Blot und Immundetektion

Der Transfer der Proteine vom SDS-PAGE auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond-P, Amersham) erfolgte im semidry Verfahren nach Kyhse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) bei RT und einer konstanten Stromstärke von 0.8 mA/cm<sup>2</sup> für 1.5 h. Als Transferpuffer wurde ein Tris/Glycin-Puffer eingesetzt (39 mM Glycin, 46 mM Tris, 0,1 % SDS und 20% Methanol). Zum Überprüfen des elektrophoretischen Transfers wurden sowohl die Gele nach dem Blotten als auch die Blotmembranen nach der Immundetektion mit Coomassie gefärbt (0.1% Coomassie G250, 45% Methanol, 10% Eisessig). Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde die Blotmembran nach dem Transfer in 1% Magermilchpulver/PBS für 1h bei RT inkubiert. Danach wurde je dreimal je 3 min mit 0.1% Tween-20/PBS gewa-

schen. Alle nachfolgenden Antikörperinkubationen und Waschschritte erfolgten in 0.1% Tween-20/ PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (goat-polyklonaler anti-GFP) erfolgte für 1h bei RT. Danach wurde 3 x 5 min gewaschen und für 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper (donkey anti-goat IgG Hoseradish Peroxidase gelabelt, Santa Cruz Biotechnology) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System von Amersham nach den Angaben des Herstellers.

10

A B C D E F



15

#### Inhibition der GFP-Expression im Serum.

Je 3  $\mu$ l Serum wurden im 15% SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot quantifiziert: A) PBS-Kontrolle; B) K1 - Kontrolle (0-22-0); C) K3-Kontrolle (2-19-2); D) S1 (0-22-2); E) S7 (2-19-2); F) S1 (1/50 der D-Konzentration).

20

#### Hemmung der Genexpression eines Zielgens in kultivierten HELA-S3-Zellen und Mausfibroblasten durch dsRNA

25 Die Effektivität der Inhibition der YFP-Expression nach transienter Transfektion eines YFP-codierenden Plasmids auf der Basis der RNA-Interferenz mit dsRNAs läßt sich durch Gestaltung der 3'-Enden und der Länge des basengepaarten Bereichs modulieren.

30

#### Ausführungsbeispiel

Zum Wirksamkeitsnachweis der dsRNA bei der spezifischen Inhibition der Genexpression wurden transient transfizierte NIH/3T3-Zellen (Fibroblasten aus NIH Swiss Mausembryo, ECCAC (European collection of animal cell culture) Nr. 93061524) und  
 5 HELA-S3 (humane cervikale Karzinomzellen, DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) Nr. ACC 161) verwendet. Für die Transfektion wurde das Plasmid pcDNA-YFP verwendet, das ein 800 bp großes Bam HI /Eco RI-YFP-Fragment in den entsprechenden Schnittstellen des Vektors pcDNA3 enthält.  
 10 Aus der Sequenz des Yellow-fluoreszierenden Proteins (YFP) wurden daraus abgeleitete doppelsträngige RNAs (dsRNAs) hergestellt und zusammen mit dem pcDNA-YFP transient in die Fibroblasten transfiziert. Anschließend wurde die Fluoreszenzabnahme gegenüber Zellen ohne dsRNA und gegenüber Zellen, die mit  
 15 pcDNA-YFP und einer Kontroll-dsRNA (nicht aus der YFP-Sequenz abgeleitet) transfiziert wurden, ausgewertet.

#### Versuchsprotokoll

##### dsRNA-Synthese

20 Mittels eines RNA-Synthesizers (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Re-  
 25 inigung der rohen Syntheseprodukte mit Hilfe der HPLC. Verwendet wurde die Säule NucleoPac PA-100, 9x250 mm, der Fa. Dionex; als Niedersalz-Puffer 20 mM Tris, 10 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6.8, 10% Acetonitril und als Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6.8, 10% Acetonitril. Der Fluß betrug 3 ml/ Minute. Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Aufheizen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.8, 100 mM  
 30



NaCl, auf 80-90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur.

#### Aussaat der Zellen

- 5 Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer entsprechenden Werkbank (HS18, Hera Safe, Kendro, Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung der NIH/3T3-Zellen und der HELA-S3 erfolgte im Brutschrank (CO<sub>2</sub>-Inkubator T20, Hera cell, Kendro, Heraeus) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luft-
- 10 feuchtigkeit in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Biochrom), für die Mausfibroblasten, und Ham's F12 für die HELA-Zellen mit 10% FCS (fetal calf serum, Biochrom), 2 mM L-Glutamin (Biochrom) und Penicillin/Streptomycin (100 IE/100 µg/ml, Biochrom). Um die Zellen in der exponentiellen
- 15 Wachstumsphase zu halten, wurden die Zellen alle 3 Tage passagiert. 24 Stunden vor der Durchführung der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (10x Trypsin/EDTA, Biochrom, Deutschland) und mit einer Zelldichte von  $1.0 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung in einer 96-Loch-Platte (Multiwell Schalen 96-
- 20 Well Flachboden, Labor Schubert & Weiss GmbH) in 150 µl Wachstumsmedium ausgesät.

#### Durchführung der transienten Transfektion

- Die Transfektion wurde mit Lipofectamine Plus<sup>TM</sup> Reagent (Life
- 25 Technologies) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Well wurden 0.15 µg pcDNA-YFP-Plasmid eingesetzt. Das Gesamt-Transfektionsvolumen betrug 60 µl. Es wurden jeweils 3fach-Proben angesetzt. Die Plasmid-DNA wurde zuerst zusammen mit der dsRNA komplexiert. Dazu wurde die Plasmid-DNA und die
- 30 dsRNA in serumfreiem Medium verdünnt und pro 0.1 µg Plasmid-DNA 1 µl PLUS Reagent eingesetzt (in einem Volumen von 10 µl) und nach dem Mischen für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde pro 0.1 µg Plasmid-DNA 0.5 µl Lipofectamine in insgesamt 10 µl serumfreiem Medium

verdünnt, gut gemischt, zu dem Plasmid/dsRNA/PLUS-Gemisch zugegeben und nochmals 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden dazu 1 x mit 200 µl serumfreiem Medium gewaschen und  
 5 danach mit 40 µl serumfreiem Medium bis zur Zugabe von DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine weiter im Brutschrank inkubiert. Nach der Zugabe von 20 µl DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine pro Well wurden die Zellen für 2.5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach der Inkubation 1 x  
 10 mit 200 µl Wachstumsmedium gewaschen und für 24 Stunden bis zur Detektion der Fluoreszenz in 200 µl Wachstumsmedium im Brutschrank inkubiert.

#### Detektion der Fluoreszenz.

15 24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel wurde die Fluoreszenz der Zellen am Fluoreszenz-Mikroskop (IX50-S8F2, Fluoreszenz-Einheit U-ULS100Hg, Brenner U-RFL-T200, Olympus) mit einer USH-I02D-Quecksilber-Lampe (USHIO Inc., Tokyo, Japan), ausgestattet mit einem WIB-Fluoreszenz-Würfel und einer digi-  
 20 talen CCD-Kamera (Orca IIIm, Hamamatsu) und C4742-95 Kamera-Controller) photographiert. Die Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit der analysis-Software 3.1 (Soft Imaging Sytem GmbH, Deutschland). Um die YFP-Fluoreszenz in Relation zur Zelldichte zu setzen, wurde eine Zellkernfärbung (Hoechst-  
 25 Staining) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 100 µl Methycarnoy (75% Methanol, 25% Eisessig) zuerst für 5 und danach nochmals für 10 Minuten in Methycarnoy fixiert. Nach dem Lufttrocknen wurden die fixierten Zellen für 30 Minuten im Dunkeln mit 100 µl pro Well Hoechst-Farbstoff (75 ng/ml) inkubiert. Nach 2maligem Waschen mit PBS (PBS Dulbecco w/o Ca<sup>2+</sup>,  
 30 Mg<sup>2+</sup>, Biochrom) wurden die Hoechst-gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus, WU-Fluoreszenz-Würfel für Hoechst) photographiert.



In den Abb. 1 bis 5 ist die Inhibition der YFP-Expression durch dsRNA in kultivierten Maus-Fibroblasten dargestellt: Die Abbildungen 1, 2 und 3 sind Graphiken, die den Effekt von dsRNAs, die aus der Sequenz von YFP abgeleitet sind, und von Kontroll-dsRNAs auf die YFP-Expression in NIH/3T3-Mausfibroblasten nach transienter Transfektion zeigen, wie im Versuchsprotokoll beschrieben. Die Konzentration der dsRNA bezieht sich auf die Konzentration im Medium und ist auf der x-Achse angegeben. Die Bezeichnung für die dsRNAs sind der Tabelle „Sequenzen“ zu entnehmen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenz pro Bildausschnitt in % Fläche. Pro Well wurden 3 verschiedene Bildausschnitte ausgewertet. Die Mittelwerte ergeben sich aus den 3fach-Ansätzen. In den Abb. 4 und 6 ist die spezifische Inhibition der YFP-Genexpression durch dsRNAs in HELA-S3-Zellen dargestellt.

Die Abb. 5 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transient mit YFP transfizierten NIH/3T3-Mausfibroblasten ohne dsRNA und mit spezifisch gegen YFP gerichteten dsRNAs (x 100 Vergrößerung).

20 5A: YFP-Kontrolle

5B: S1, 10 nM

5C: S4, 10 nM

5D: S7, 10 nM

5E: S7/S12, 1 nM

25 5F: S7/S12, 1 nM

Die Abb. 6 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transient mit YFP transfizierten HELA-3S-Zellen ohne dsRNA und mit spezifisch gegen YFP gerichteten dsRNAs (x 100 Vergrößerung).

30 6A: K2-Kontrolle, 10 nM

6B: S1, 10 nM

6C: S4, 10 nM

6D: S7, 10 nM

6E: S7/11, 1 nM

6F: S7/12, 1 nM

6G: S1A/S4B, 10 nM

6H: YFP-Kontrolle

5

### Schlußfolgerungen

In Abb. 1 ist zu sehen, daß die Inhibition der YFP-Expression nach transienter Transfektion von Mausfibroblasten mit dem YFP-Plasmid zusammen mit spezifisch gegen die YFP-Sequenz gerichteten dsRNAs dann besonders wirkungsvoll gehemmt wird, wenn die 3'-Enden der 22 und 19 Basengepaare enthaltenden Bereiche der dsRNAs einzelsträngige Abschnitte von 2 Nukleotiden aufweisen. Während die dsRNA S1 mit glatten 3'-Enden bei einer Konzentration von 1 nM (bezogen auf die Konzentration im Zellkultur-Medium während der Durchführung der Transfektion) keine inhibitorischen Effekte auf die YFP-Expression zeigt, inhibieren die dsRNAs S7 (19 basengepaarte Nukleotide) und S4 (22 basengepaarte Nukleotide) mit jeweils 2nt Überhängen auf beiden 3'-Enden die YFP-Expression um 50 bzw. um 70% im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-dsRNAs K3 und K2, deren Sequenzen nicht aus der YFP-Sequenz abgeleitet sind. Bei einer Konzentration von 10 nM inhibiert die als S1 bezeichnete dsRNA mit glatten Enden die YFP-Expression um ~65%, während die Inhibition der YFP-Expression durch die S4 dsRNA ~93% beträgt. Der inhibitorische Effekt der mit S4 und S7 bezeichneten dsRNAs ist konzentrationsabhängig (Abb. 1 und 2, siehe auch Abb. 4). Weiterhin ist aus der Abb. 2 zu entnehmen, daß für die effiziente Unterdrückung der YFP-Genexpression die einzelsträngige Ausbildung nicht an beiden 3'-Enden (auf sense und antisense-Strang) notwendig ist. Um eine möglichst effektive Inhibition der YFP-Expression zu erreichen, ist lediglich der 2nt-Überhang am 3'-Ende auf dem antisense-Strang (dem zur YFP-mRNA komplementären Bereich) notwendig. So liegt die Inhibition der

YFP-Expression bei einer Konzentration von 1 nM bei beiden dsRNAs S4 (mit 2nt-Überhängen auf beiden 3'-Enden) und S1A/S4B (mit einem 2nt-Überhang auf dem 3'-Ende des antisense-Stranges) bei ~70%. Befindet sich dagegen der 2nt-Überhang auf dem 3'-Ende des sense-Stranges (und das 3'-Ende des antisense-Stranges trägt keinen einzelsträngigen Bereich) so liegt die Inhibition der YFP-Genexpression lediglich bei 50%. Analog ist die Inhibition bei höheren Konzentrationen deutlich besser, wenn mindestens das 3'-Ende des antisense-Stranges einen 2nt-Überhang trägt.

Eine weitere Erhöhung der Hemmung der YFP-Expression wird erreicht, wenn der basengepaarte Bereich 21 Nukleotid-Paare statt 22 (S1 und S4) oder 19 (S7) umfasst. So beträgt die Inhibition der YFP-Expression durch S1 (22 Basenpaarungen mit glatten Enden) ~40%, während die Inhibition durch S7/S12 (21 Basenpaarungen mit glatten Enden) bei ~92% liegt. Enthält die dsRNA mit 21 Basenpaarungen noch einen 2nt-Überhang am antisense-3'-Ende (S7/S11), so liegt die Inhibition bei ~ 97% (verglichen mit ~73% Inhibition durch S4 und ~70% Inhibition durch S7).

#### Untersuchung der Serumstabilität der doppelsträngigen RNA (dsRNA)

25

Ziel ist es, die in den Zellkulturen gefundene Effektivität der durch dsRNAs vermittelten Hemmung der Genexpression von Zielgenen für den Einsatz *in vivo* noch weiter zu steigern, indem durch die Erhöhung der Stabilität der dsRNAs im Serum und damit deren Verweilzeit unter *in vivo*-Bedingungen die wirksame Konzentration des funktionellen Moleküls erhöht wird.

### Ausführungsbeispiel

Die Serumstabilität der die GFP-Expression hemmenden doppelsträngigen Oligoribonukleotide (dsRNA) wurde ex vivo in murinem und humanem Serum getestet.

### Versuchsprotokoll

Die Inkubation mit humanem bzw. murinem Serum mit der entsprechenden dsRNA erfolgte bei 37°C in Heizblock. Es wurden je 85 µl Serum mit 15 µl 100µM dsRNA inkubiert. Nach bestimmten Inkubationszeiten (30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h) wurden die Proben sofort bei -80°C eingefroren. Als Kontrolle wurde dsRNA ohne Serum (+85 µl ddH<sub>2</sub>O) und dsRNA mit Serum zum Zeitpunkt 0 verwendet.

Für die Isolierung der dsRNA aus dem Inkubationsansatz, die auf Eis erfolgte, wurden jeweils 400 µl 0.1% SDS zu den Ansätzen gegeben und einer Phenolextraktion unterzogen: Pro Ansatz wurden 500 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (IAA, 25:24:1, Roti<sup>®</sup>-Phenol, Roth, Karlsruhe) zugegeben und für 30 sec auf höchster Stufe gevortext (Vortex Genie-2; Scientific Industries). Nach 10minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 12.000xg, 4°C, für 10 min (Sigma 3K30, Rotor 12131-H). Die obere wässrige Phase (ca. 200 µl) wurde abgenommen und zuerst einem DNase I- und danach einem Proteinase K - Verdau unterzogen: Zugabe von 20 µl 10xfach DNaseI-Puffer (100 mM Tris, pH 7.5, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) und 10 U DNase I (D7291, Sigma-Aldrich), 30 min Inkubation bei 37°C, erneute Zugabe von 6 U DNase I und Inkubation für weitere 20 min bei 37°C, Zugabe von 5 µl Proteinase K (20 mg/ml, 04-1075, Peflab, Deutschland) und 30 min Inkubation bei 37°C. Danach wurde eine Phenolextraktion durchgeführt. Dazu wurde 500 µl Phenol : Chloroform : IAA (25:24:1) zugegeben, 30

sec auf höchster Stufe gevortext, 10 min bei 12.000xg, 4°C, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nacheinander mit 40 µl 3 M Na-Ac (Natriumacetat), pH 5.2, und 1 ml 100% EtOH versetzt, dazwischen gut gemischt und für mindestens 1 h bei -80°C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 12.000xg für 30 min und 4°C pelletiert, mit 70% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 12.000xg, 4°C). Das luftgetrocknete Pellet wurde in 30 µl RNA-Gelauftragspuffer (7 M Harnstoff, 1 x TBE (0.09 M Tris-Borat, 0.002 EDTA (Ethylendiamintetraacetat), 0.02% (w/v) Bromphenolblau, 0.02% (w/v) Xylencyanol) aufgenommen und bis zum Gelauftrag bei -20°C gelagert.

Zur Charakterisierung der dsRNA wurde eine analytische, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (analytische PAGE) durchgeführt. Die Harnstoffgele wurden kurz vor dem Lauf hergestellt: 7M Harnstoff (21g) wurde in 25 ml 40% wässrige Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (Rotiphorese-Gel, A515.1, Roth) und 5 ml 10 x TBE (108 g Tris, 55 g Borsäure, 9.3 g EDTA pro L Aqua dest.) unter Rühren gelöst und auf 50 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Kurz vor dem Gießen wurden 50 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und 500 µl 10% APS (Ammoniumperoxydisulfat) zugesetzt. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in eine vertikale Elektrophorese-Apparatur (Merck, Darmstadt) eingesetzt und ein Vorlauf für 30 min bei konstant 40 mA Stromstärke durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die RNA-Proben für 5 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und für 20 sec in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, minispin) abzentrifugiert. Es wurden je 15 µl auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte für ca. 2h bei einem konstanten Stromfluß von 40 mA. Nach dem Lauf wurde das Gel 30 min bei RT (Raumtemperatur) mit Stains all-Färbelösung (20 ml Stains all Stammlösung (200 mg Stains all in 200 ml Formamid gelöst) mit 200 ml Aqua dest. und 180 ml Formamid versetzt) gefärbt und die Hintergrundfär-

bung danach durch Spülen in Aqua dest. für 45 min entfernt. Die Gele wurden mit dem Photodokumentationssystem Image Master VDS von Pharmacia photographiert.

Die Abbildungen 7 bis 14 zeigen die Serumstabilität der dsRNA nach Inkubation mit humanem bzw. murinem Serum und nachfolgender elektrophoretischer Auftrennung im 20%igem 7M Harnstoffgel.

Abb. 7: Inkubation von S1 (0-22-0) in Maus-Serum

1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
2. zum Zeitpunkt 0
3. für 30 Minuten
4. für 1 Stunde
5. für 2 Stunden
6. für 4 Stunden
7. für 12 Stunden
8. 2  $\mu$ l 100  $\mu$ M S1 ohne Inkubation
- S1A) sense S1 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S1A)
- S1B) antisense S1 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S1B)

Abb. 8: Inkubation von S1 (0-22-0) in humanem Serum

1. 2  $\mu$ l 100  $\mu$ M S1 unbehandelt (ohne Inkubation)
2. für 30 Minuten
3. für 2 Stunden
4. für 4 Stunden
5. für 6 Stunden
6. für 8 Stunden
7. für 12 Stunden
8. für 24 Stunden
- S1A) sense S1 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S1A)
- S1B) antisense S1 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S1B)

Abb. 9: Inkubation von S7 (2-19-2) in Maus-Serum

1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
2. für 30 Minuten

- 3. für 4 Stunden
- 4. für 12 Stunden

Abb. 10: Inkubation von S7 (2-19-2) in humanem Serum

- 1. sense S7 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S7A)
- 5 2. antisense S7 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S7B)
- 3. für 30 Minuten
- 4. für 1 Stunde
- 5. für 2 Stunden
- 6. für 4 Stunden
- 10 7. für 6 Stunden
- 8. für 12 Stunden
- 9. für 24 Stunden
- 10. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)

Abb. 11: Inkubation von K3 (2-19-2) in Maus-Serum

- 15 1. sense K3 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M K3A)
- 2. antisense K3 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M K3B)
- 3. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
- 4. zum Zeitpunkt 0 (mit Serum)
- 5. für 30 Minuten
- 20 6. für 1 Stunde
- 7. für 2 Stunden
- 8. für 4 Stunden
- 9. für 12 Stunden

Abb. 12: Inkubation von PKC1/2 (0-22-2) in Maus-Serum

- 25 1. für 30 Minuten
- 2. für 1 Stunde
- 3. für 2 Stunden
- 4. für 4 Stunden
- 5. für 12 Stunden
- 30 6. 2  $\mu$ l 100  $\mu$ M PKC1/2 (unbehandelt)

Abb. 13: Inkubation von S1A/S4B (0-22-2) in humanem Serum

- 1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)



2. für 24 Stunden
3. für 12 Stunden
4. für 8 Stunden
5. für 6 Stunden
- 5 6. für 4 Stunden
7. für 2 Stunden
8. für 30 Minuten
9. sense K3 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M K3A)
10. antisense K3 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M K3B)

10 Abb. 14: Inkubation von K2 (2-22-2) in humanem Serum

1. sense K2 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M K2A)
2. antisense K2 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M K2B)
3. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
4. für 30 Minuten
- 15 5. für 2 Stunden
6. für 4 Stunden
7. für 6 Stunden
8. für 8 Stunden
9. für 12 Stunden
- 20 10. für 24 Stunden

### Schlußfolgerungen

dsRNAs ohne einzelsträngige Bereiche an den 3'-Enden sind im Serum sowohl von Mensch und Maus wesentlich stabiler als  
 25 dsRNAs mit einzelsträngigen 2nt-Überhängen an den 3'-Enden (Abb. 7 bis 11 und 14). Nach 12 bzw. 24 Stunden Inkubation von S1 in murinem bzw. humanem Serum ist noch immer eine Bande in der ursprünglichen Größe fast vollständig erhalten. Dagegen nimmt bei dsRNAs mit 2nt-Überhängen an beiden 3'-Enden die  
 30 Stabilität in humanem als auch im murinen Serum deutlich ab. Bereits nach 4 Stunden Inkubation von S7 (Abb. 9 und 10) oder K3 (Abb. 11) ist keine Bande in der Originalgröße mehr detektierbar. Die Länge des basengepaarten Bereichs hat dabei

keinen Einfluß auf die Stabilität, wie ein Vergleich der Serumstabilität von K2 (2-22-, Abb. 14) mit S7 bzw. K3 zeigt. Um die Stabilität von dsRNA im Serum zu erhöhen, ist es ausreichend, wenn die dsRNA ein glattes Ende besitzt. Im Maus-Serum ist nach 4 Stunden Inkubation Abb. 12, Bahn 5) die Bande in der Originalgröße kaum abgebaut im Vergleich zu S7 (nach 4 Stunden vollständiger Abbau, Abb. 9, Bahn 3).

⇒ Kombination von Serumstabilität und Effizienz bei der Inhibition von Zielgenen: als optimaler Kompromiß hinsichtlich der biologischen Wirksamkeit von dsRNA kann die Verwendung von dsRNA mit einem glattem Ende und einem einzelsträngigem Bereich von 2 Nukleotiden angesehen werden, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende der zum Zielgen komplementären Sequenz auf dem als antisense bezeichneten Strang (S1) befinden muß.

## Sequenzen

<b>S1</b>	(A) 5`- CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3` (B) 3`- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5`	0-22-0
<b>S7</b>	(A) 5`- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3` (B) 3`- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUG -5`	2-19-2
<b>K1</b>	(A) 5`- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3` (B) 3`- UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5`	0-22-0
<b>K3</b>	(A) 5`- GAUGAGGAUCGUUUCGCAUGA -3` (B) 3`- UCCUACUCCUAGCAAAGCGUA -5`	2-19-2
<b>K2</b>	(A) 5`- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3` (B) 3`- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5`	2-22-2
<b>S1A/ S4B</b>	(A) 5`- CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3` (B) 3`- CTGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5`	0-22-2
<b>PKC 1/2</b>	(A) 5`- CUUCUCCGCCUCACACCGCUGCAA -3` (B) 3`- GAAGAGGCGGAGUGUGGCGACG -5`	2-22-0
<b>S7/S12</b>	(A) 5`- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3` (B) 3`- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5`	0-21-0
<b>S7/S11</b>	(A) 5`- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3` (B) 3`- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5`	0-21-2
<b>S4</b>	(A) 5`- CCACAUGAAGCAGCACGACUUCUU -3` (B) 3`- CTGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5`	2-22-2
<b>K1A/ K2B</b>	(A) 5`- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3` (B) 3`- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5`	0-22-2

<b>K1B/ K2A</b>	(A) 5` - ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3` (B) 3` - UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5`	<b>2-22-0</b>
<b>S1B/ S4A</b>	(A) 5` - CCACAUGAAGCAGCACGACUUCUU -3` (B) 3` - GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5`	<b>2-22-0</b>

## Anspruchskomplex

Es wird Schutz für die folgenden Merkmale einzeln oder in Kombination beansprucht:

5

1. Verfahren zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle, wobei ein doppelsträngiges Oligoribonukleotid (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird, wobei ein Strang (S1) der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich  
10 aufweist,

dadurch gekennzeichnet, daß

die dsRNA am 5'-Ende des einen Strangs (S1) glatt ausgebildet  
15 ist und am 3'-Ende des einen Strangs (S1) einen Überhang von 1 bis 4 Nukleotiden aufweist.

20

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Überhang aus 1 oder 2 Nukleotiden gebildet ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA weniger als 50, vorzugsweise weniger als 25, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

25 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA 19 bis 24, vorzugsweise 19 oder 22, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
30 die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zur Applikation in einer Pufferlösung aufgenommen ist.



7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA oral, inhalativ, intratumoral, intravenös oder intraperitoneal verabreicht wird.
- 5
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, eingeschlossen wird.
- 10
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen wird.
- 15
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA mittels Injektion oder Infusion verabreicht wird.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag verabreicht wird.
- 20
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimiert wird.
- 25
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.
- 30
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 5 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Enden der dsRNA modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
- 10 18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht wird.
- 15 19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.
- 20 20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloga gebildet wird.
- 25 21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird.
- 30 22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.



23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
- 5 24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 10 25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
26. Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen  
15 Zielgens in einer Zelle, enthaltend mindestens ein doppelsträngiges Oligoribonukleotid (dsRNA), wobei ein Strang (S1) der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß  
20 die dsRNA am 5'-Ende des einen Strangs (S1) glatt ausgebildet ist und am 3'-Ende des einen Strangs (S1) einen Überhang von 1 bis 4 Nukleotiden aufweist.
- 25 27. Medikament nach Anspruch 26, wobei der Überhang aus 1 oder 2 Nukleotiden gebildet ist.
28. Medikament nach Anspruch 26 oder 27, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA weniger als 50, vorzugsweise weniger  
30 als 25, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
29. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 28, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA 19 bis 24, vorzugsweise 19 oder 22, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.



30. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 29, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 5 31. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 30, wobei die dsRNA zur Applikation in einer Pufferlösung aufgenommen ist.
32. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 31, wobei die dsRNA oral, inhalativ, intratumoral, intravenös oder intrape-  
10 ritoneal verabreicht wird.
33. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 32, wobei die dsRNA in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, eingeschlossen ist.
- 15 34. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 33, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.
- 20 35. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 34, wobei die dsRNA mittels Injektion oder Infusion verabreichbar ist.
36. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 35, wobei es  
25 derart portioniert ist, dass die dsRNA in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag verabreichbar ist.
37. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 36, wobei das  
30 Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.
38. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 37, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen.

39. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 38, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.

5

40. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 39, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

41. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 40, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

10

42. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 41, wobei die Enden der dsRNA modifiziert sind, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

15

43. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 42, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht ist.

20

44. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 43, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet ist.

25

45. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 44, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloga gebildet ist.

30

46. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 45, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist.

47. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 46, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
- 5 48. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 47, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
- 10 49. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 48, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 15 50. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 49, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
- 20 51. Verwendung eines doppelsträngigen Oligoribonukleotids (dsRNA), bei dem ein Strang (S1) der dsRNA einen zu einem Zielgen komplementären Bereich aufweist, wobei die dsRNA am 5'-Ende des einen Strangs (S1) glatt ausgebildet ist und am 3'-Ende des einen Strangs (S1) einen Überhang von 1 bis 4 Nukleotiden aufweist, zur Hemmung der Expression des Zielgens in einer Zelle
- 25 52. Verwendung nach Anspruch 51, wobei der Überhang aus 1 oder 2 Nukleotiden gebildet ist.
- 30 53. Verwendung nach Anspruch 51 oder 52, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA weniger als 50, vorzugsweise weniger als 25, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
54. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 53, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA 19 bis 24, vorzugsweise 19 oder 22, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

55. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 54, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 5 56. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 55, wobei die dsRNA zur Applikation in einer Pufferlösung aufgenommen ist.
57. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 56, wobei die dsRNA oral, inhalativ, intrataumoral, intravenös oder intrape-  
10 ritoneal verabreicht wird.
58. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 57, wobei die dsRNA in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, eingeschlossen wird.  
15
59. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 58, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen wird.  
20
60. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 59, wobei die dsRNA mittels Injektion oder Infusion verabreicht wird.
- 61.. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 60, wobei die  
25 dsRNA in einer menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag verabreicht wird.
62. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 61, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimiert wird.  
30
- 63.. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 62, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Priongen.

64. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 63, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.

5 65. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 64, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

66. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 65, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

10

67. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 66, wobei die Enden der dsRNA modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

15

68. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 67, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht wird.

20

69. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 68, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

25

70. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 69, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloga gebildet wird.

30

71. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 70, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird.



72. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 71, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
- 5 73. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 72, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
- 10 74. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 73, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 15 75. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 74, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

Zur Erläuterung der vorgenannten Merkmale wird insbesondere auch auf die WO00/44895 verwiesen, deren Offenbarungsgehalt  
20 hiermit vollinhaltlich einbezogen wird.

Abb. 1

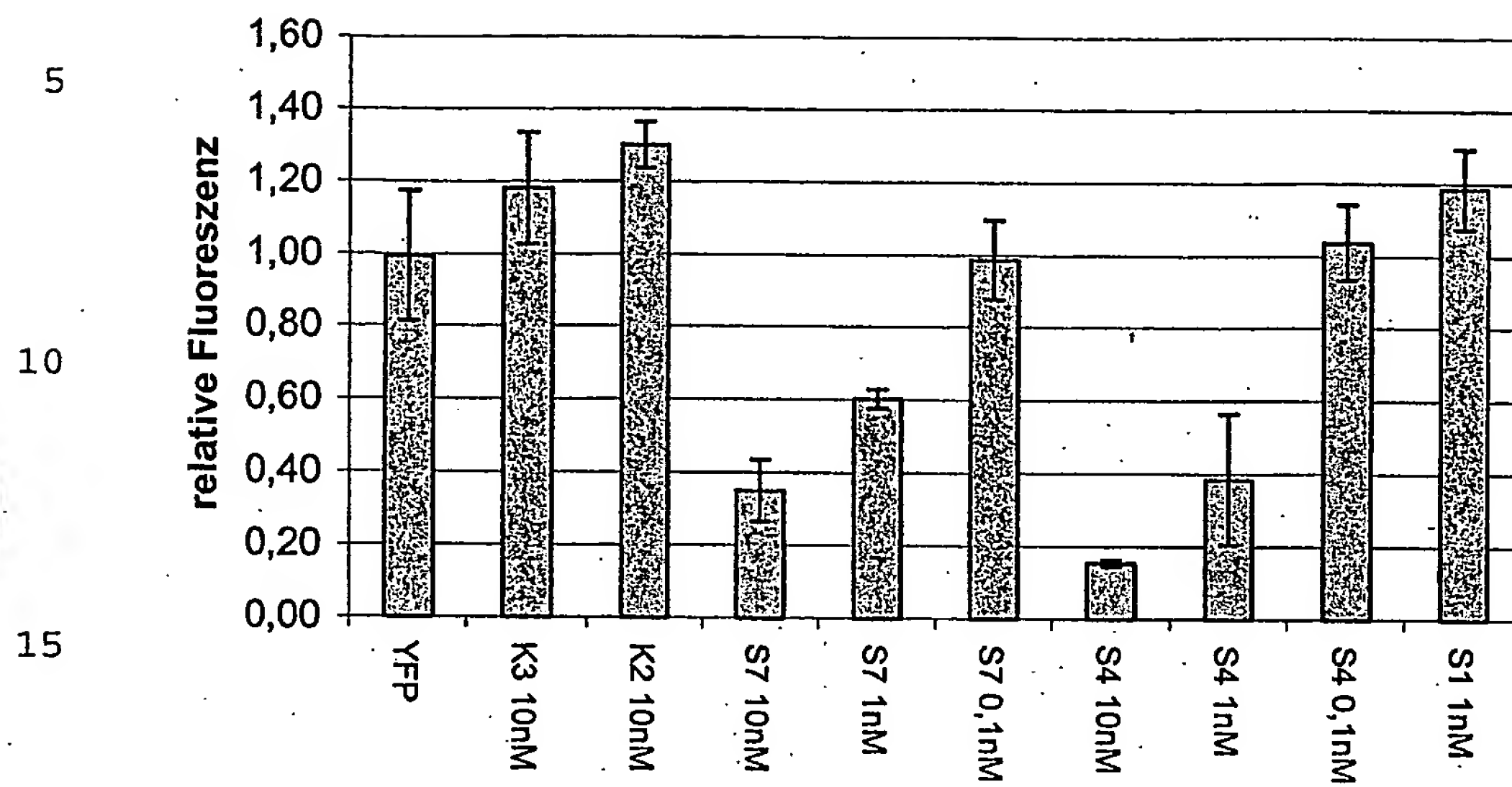


Abb. 2

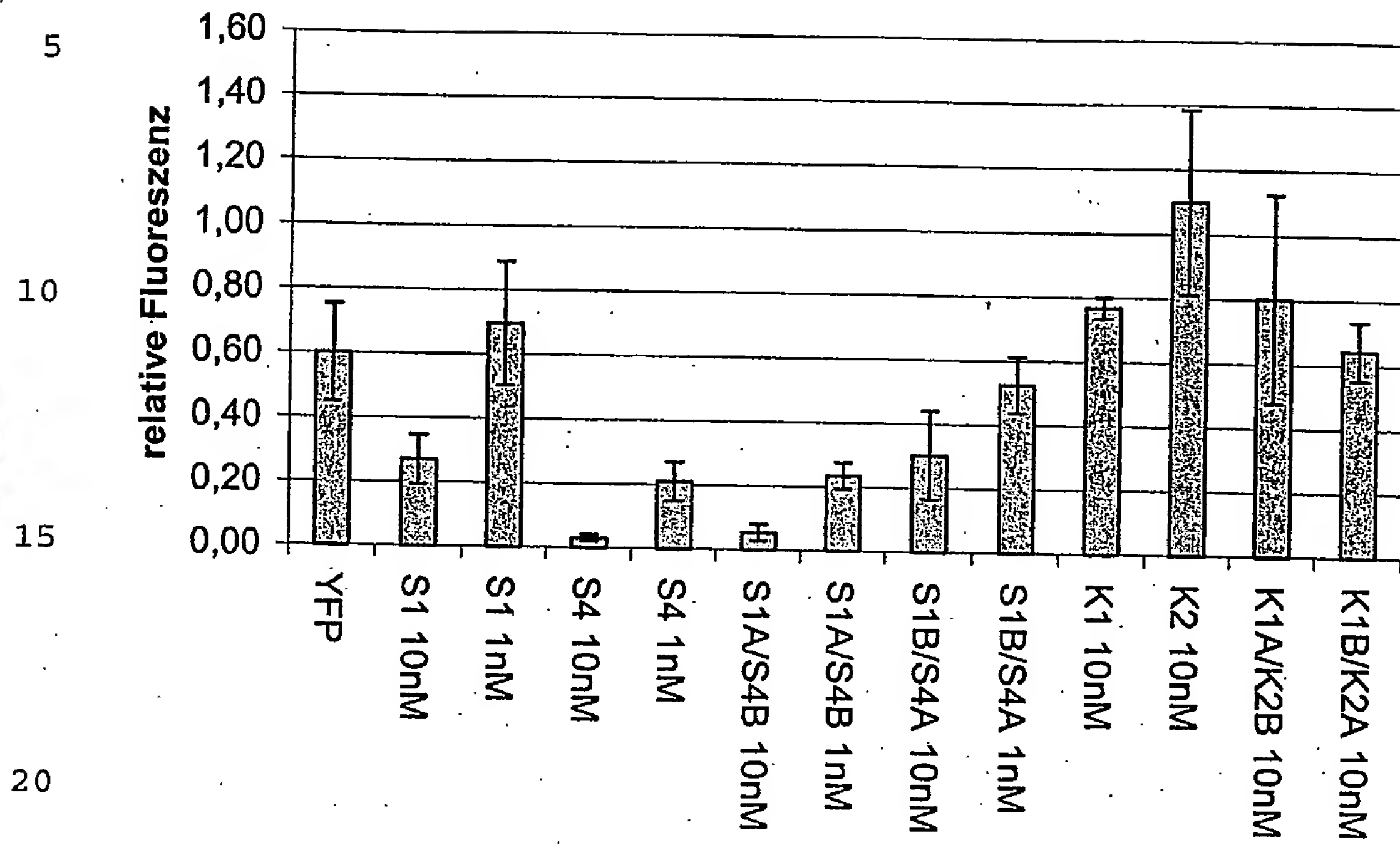


Abb. 3

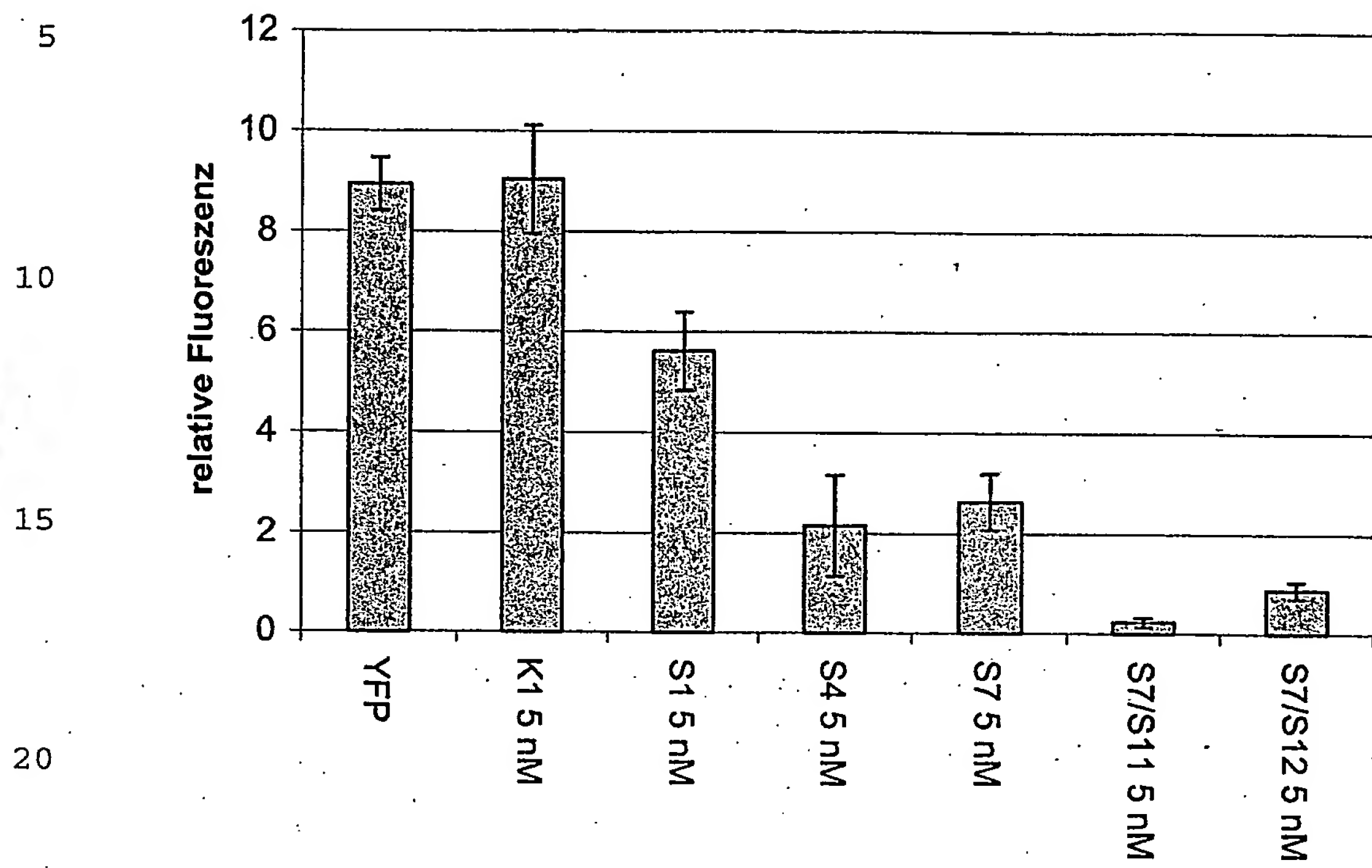


Abb. 4

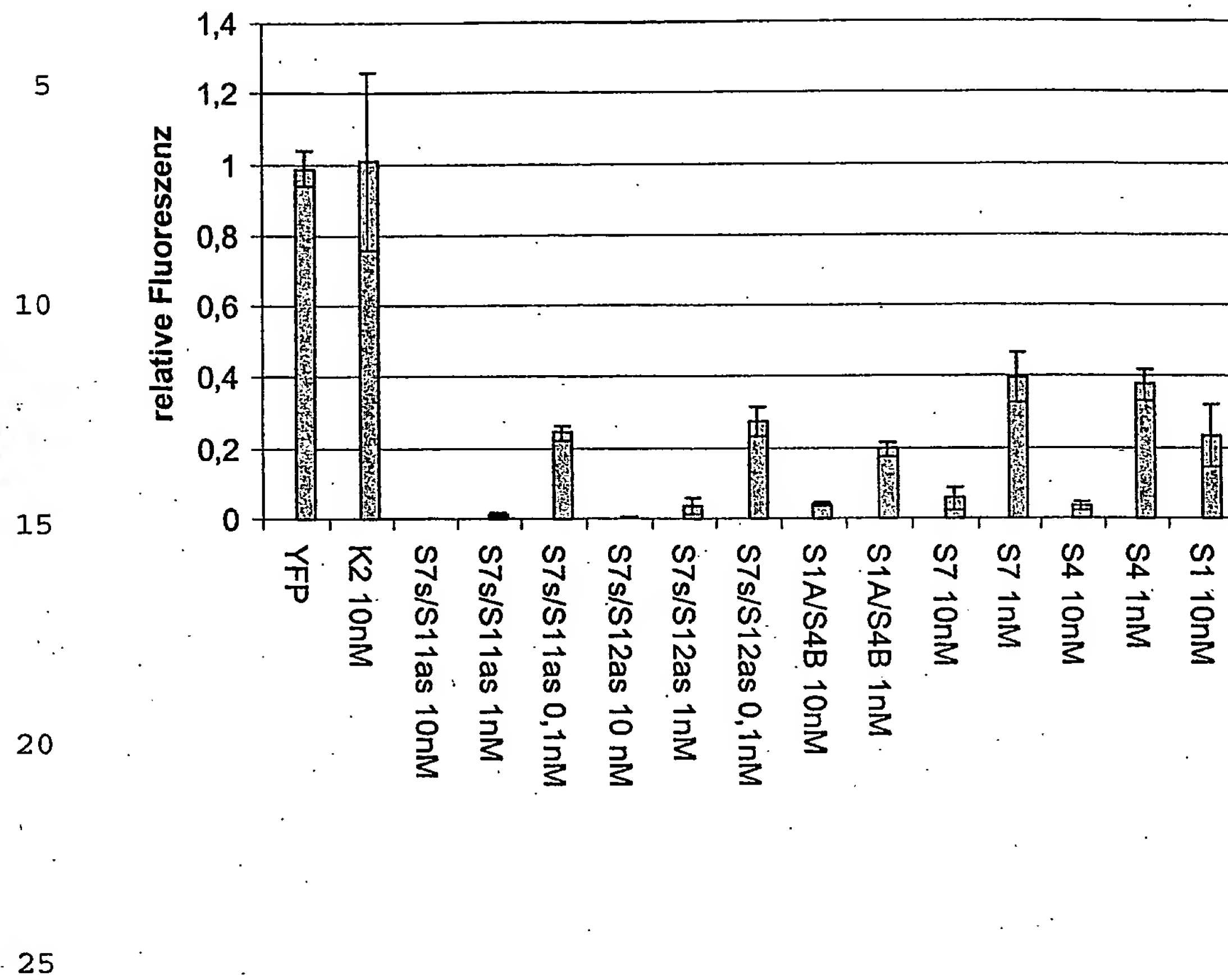


Abb. 5

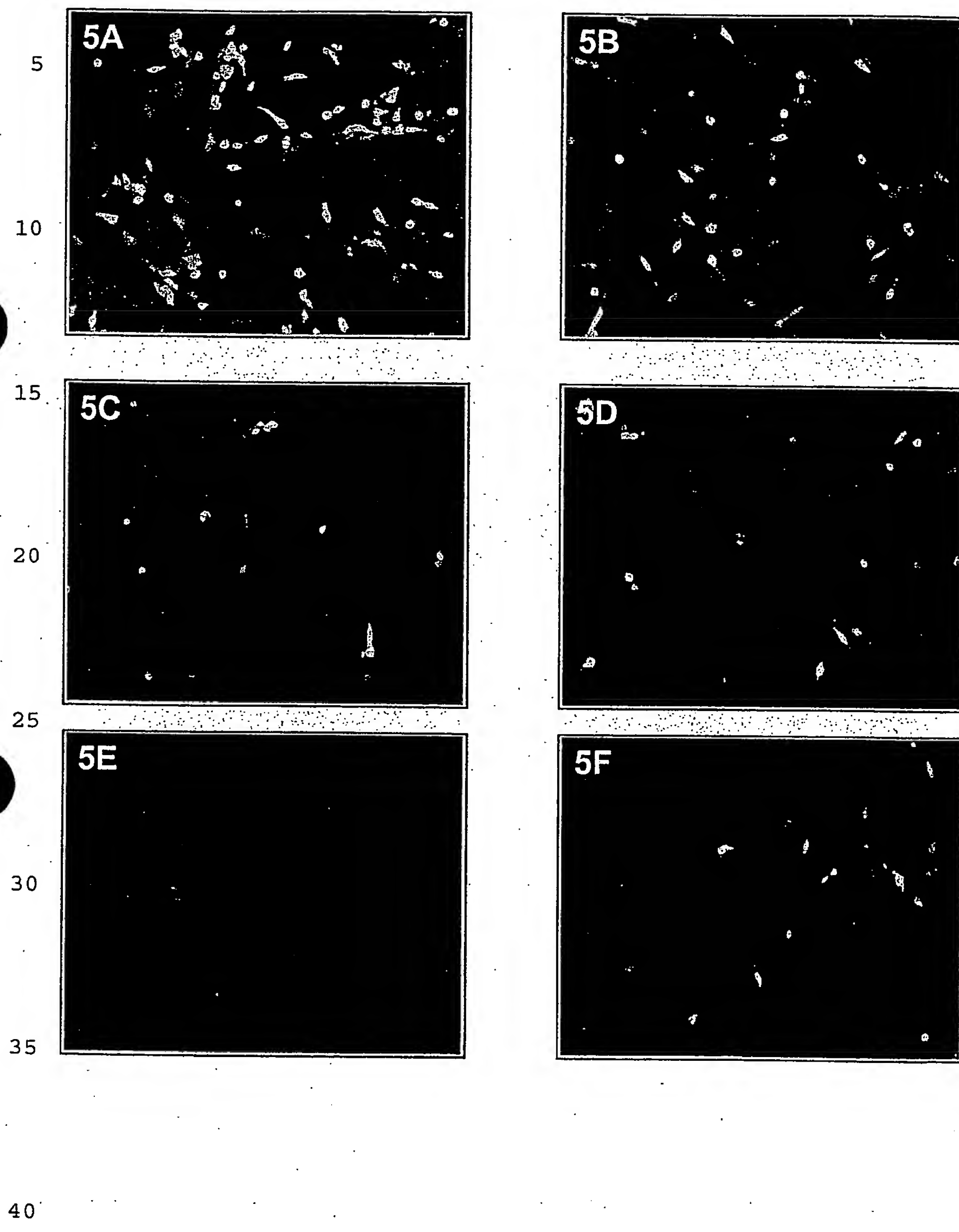
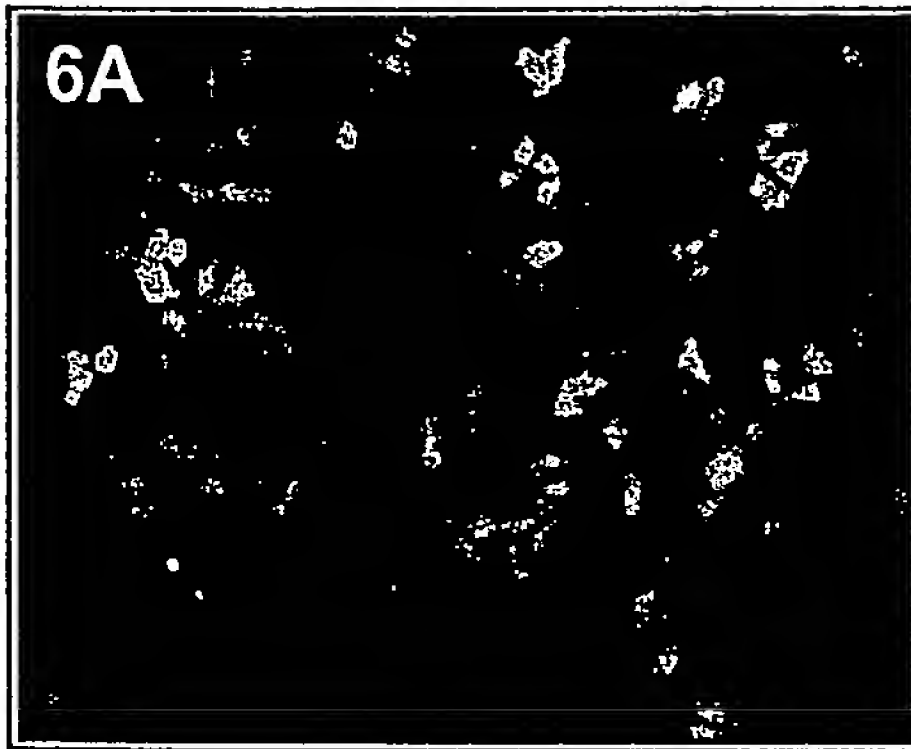


Abb. 6

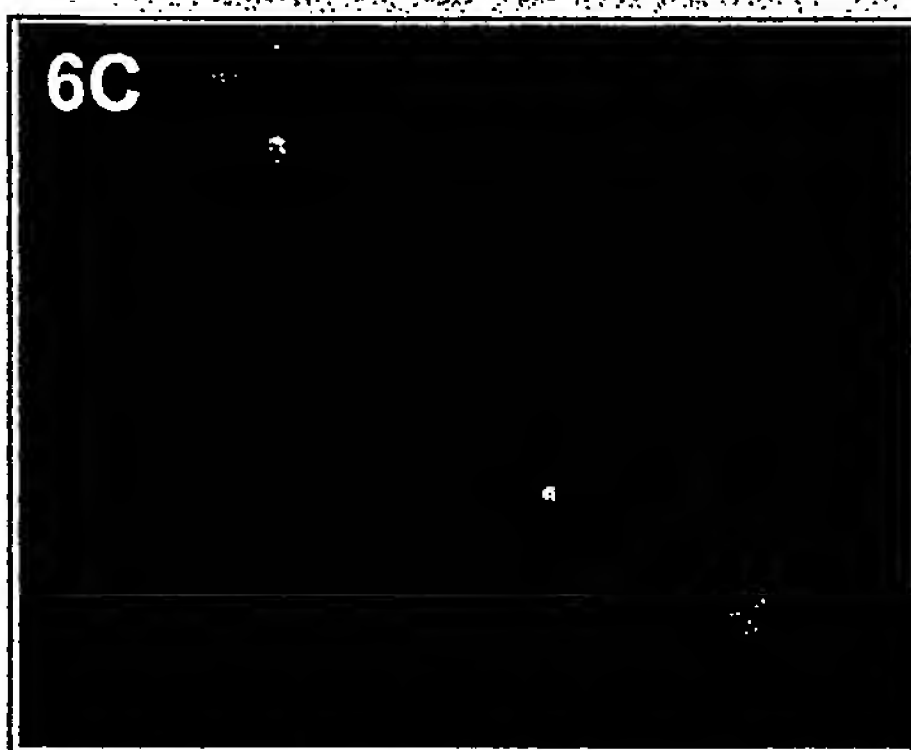
5



10



15



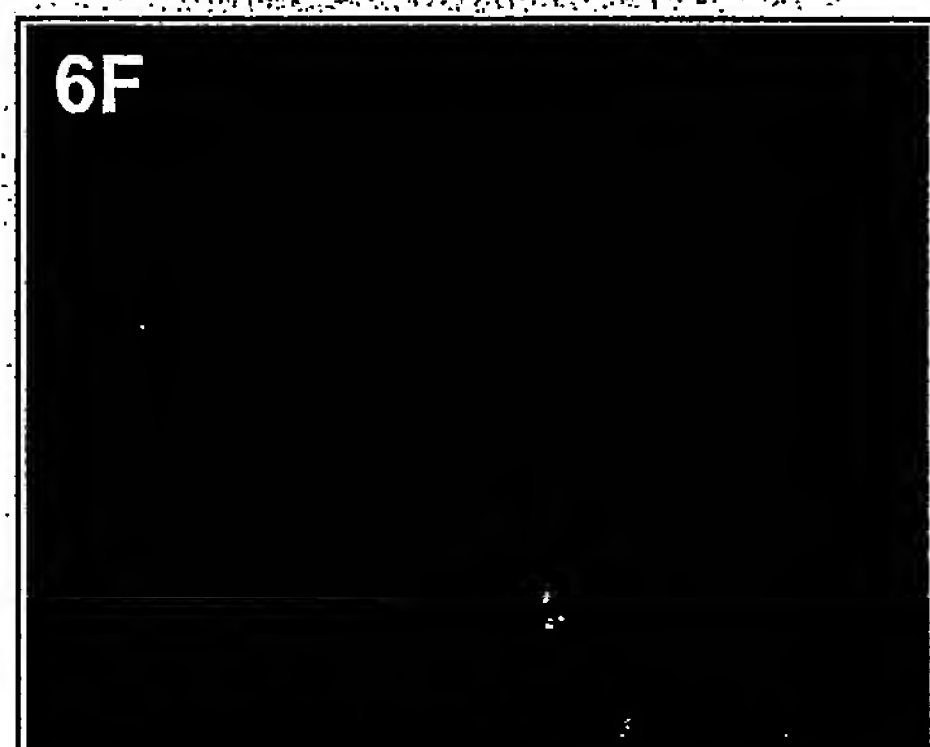
20



25



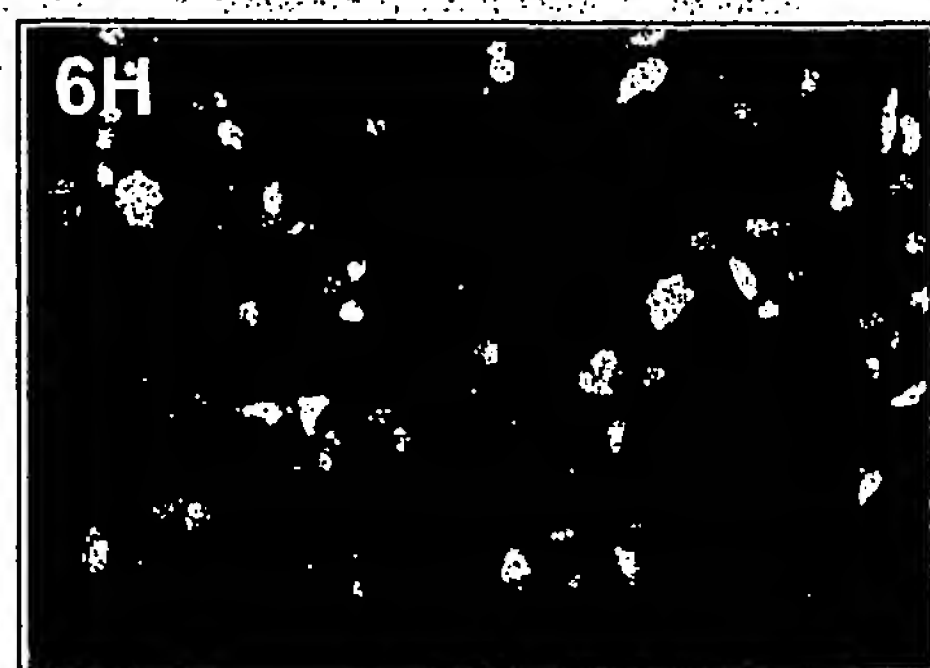
30



35



40



Do



5

Abb. 7

10

15

20

25

30

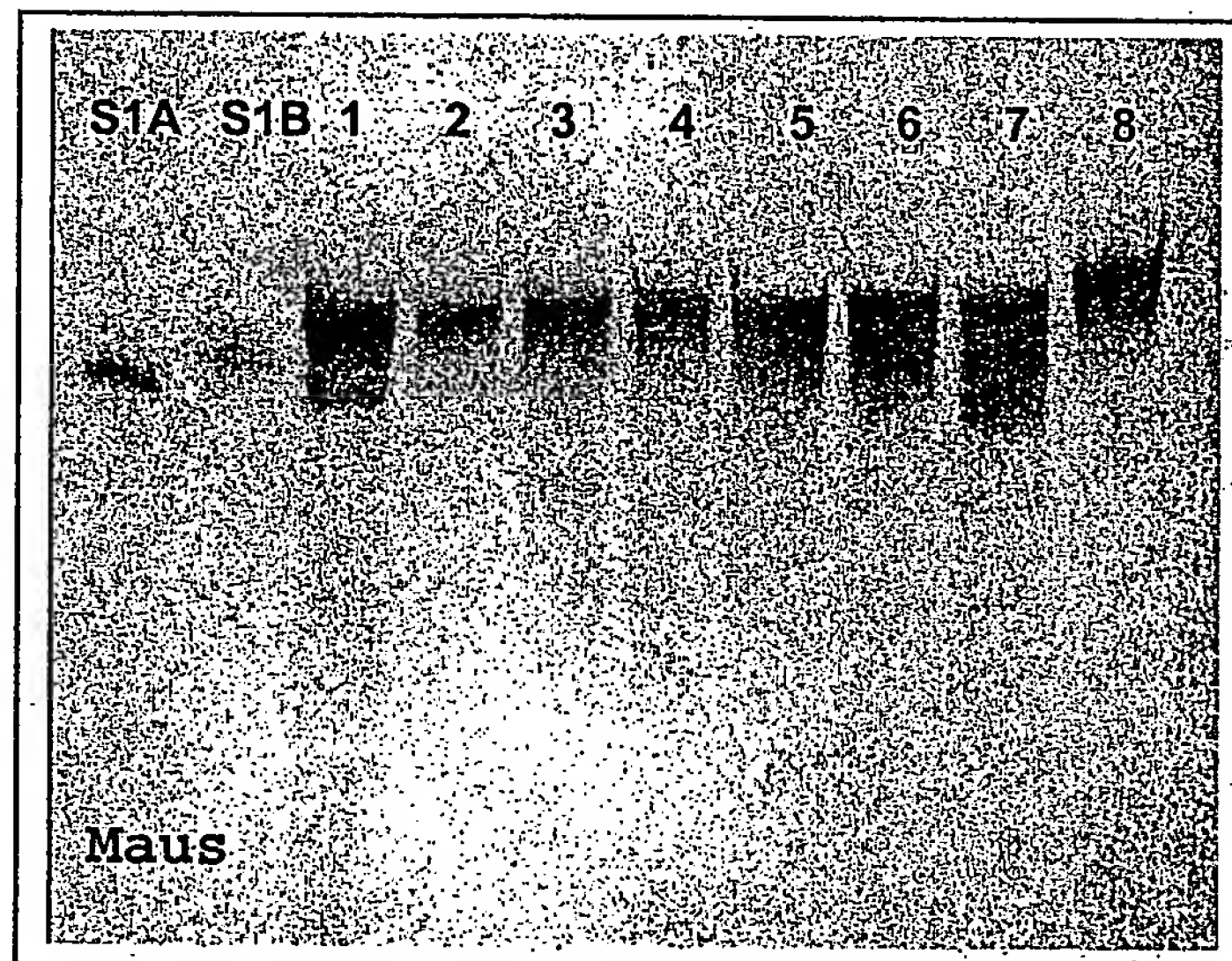


Abb. 8

5

10

15

20

25

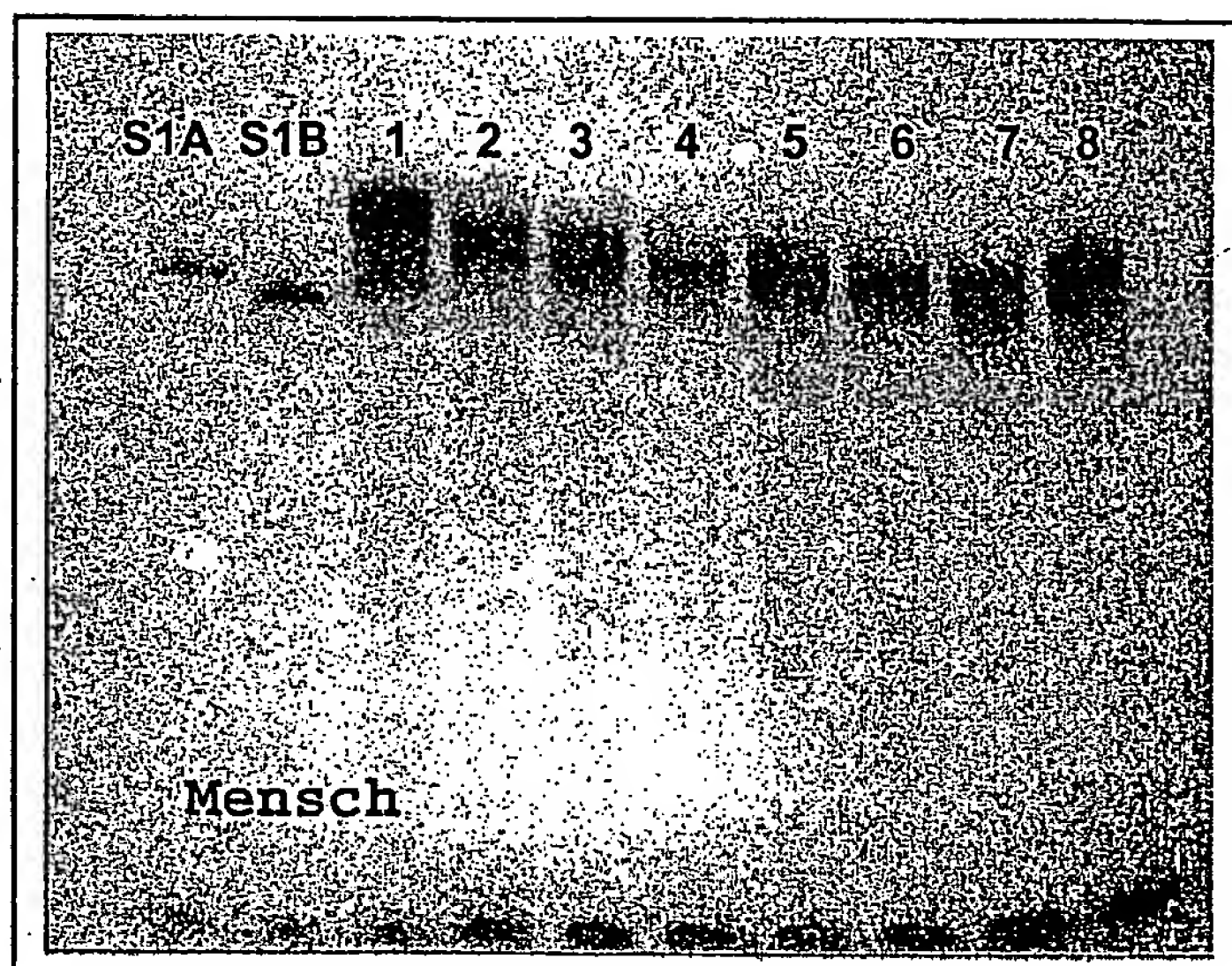


Abb. 9

5

10

15

20

25

30

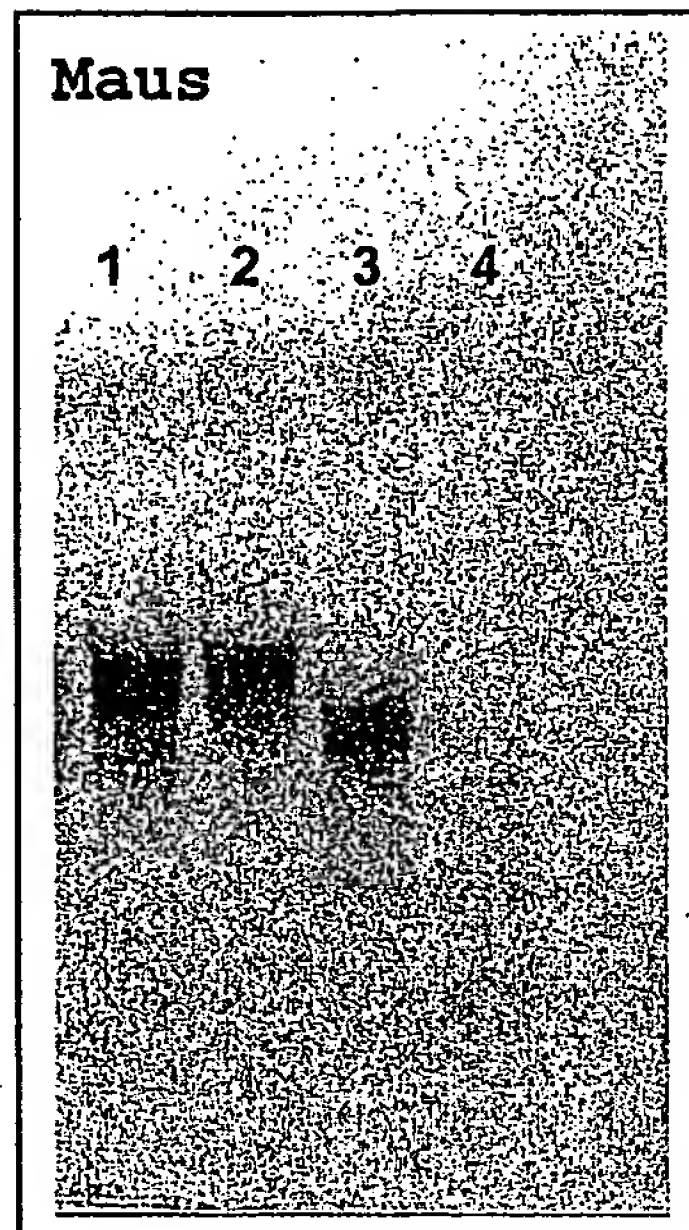


Abb. 10

5

S7

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

10

15

20

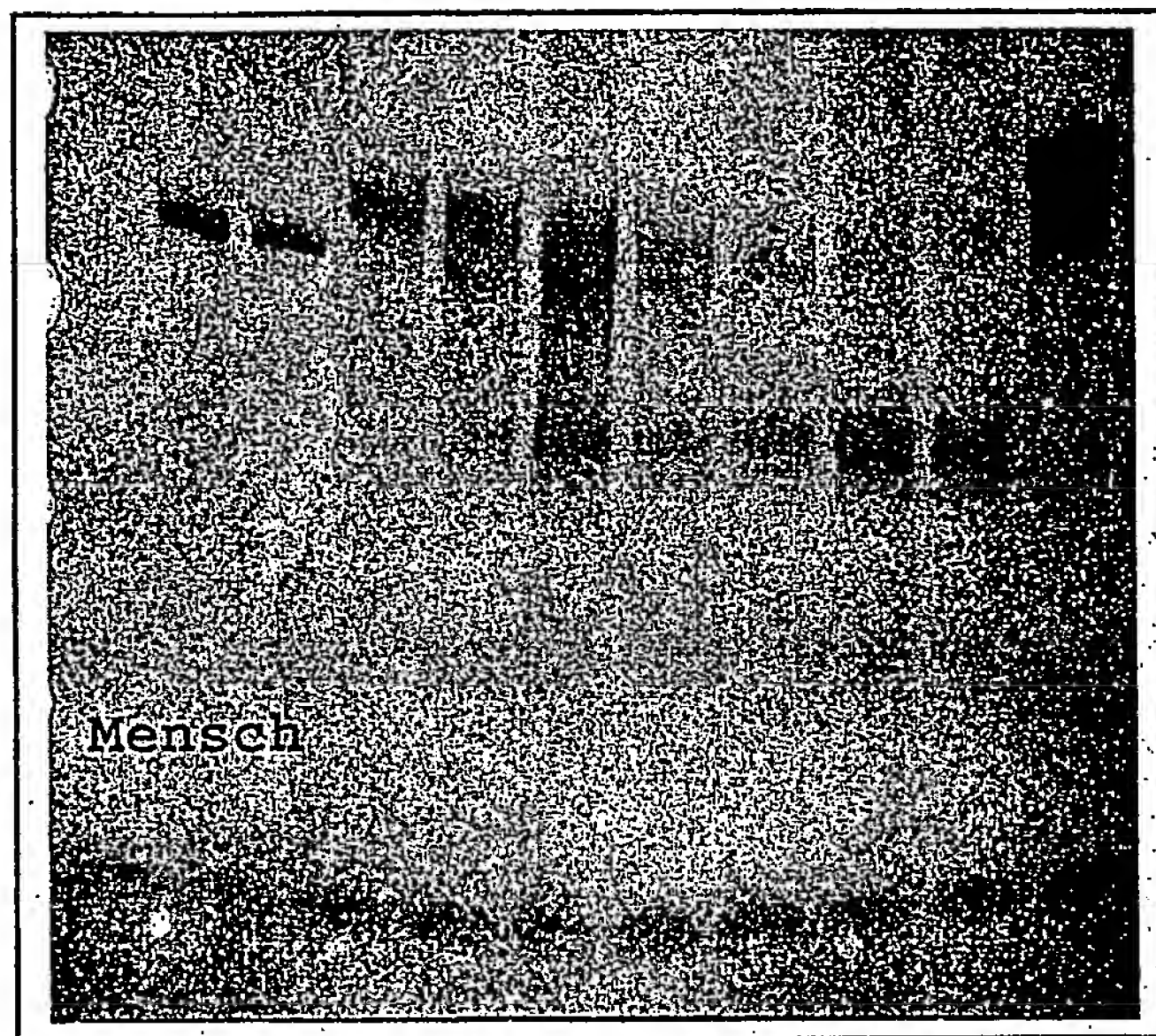




Abb. 11

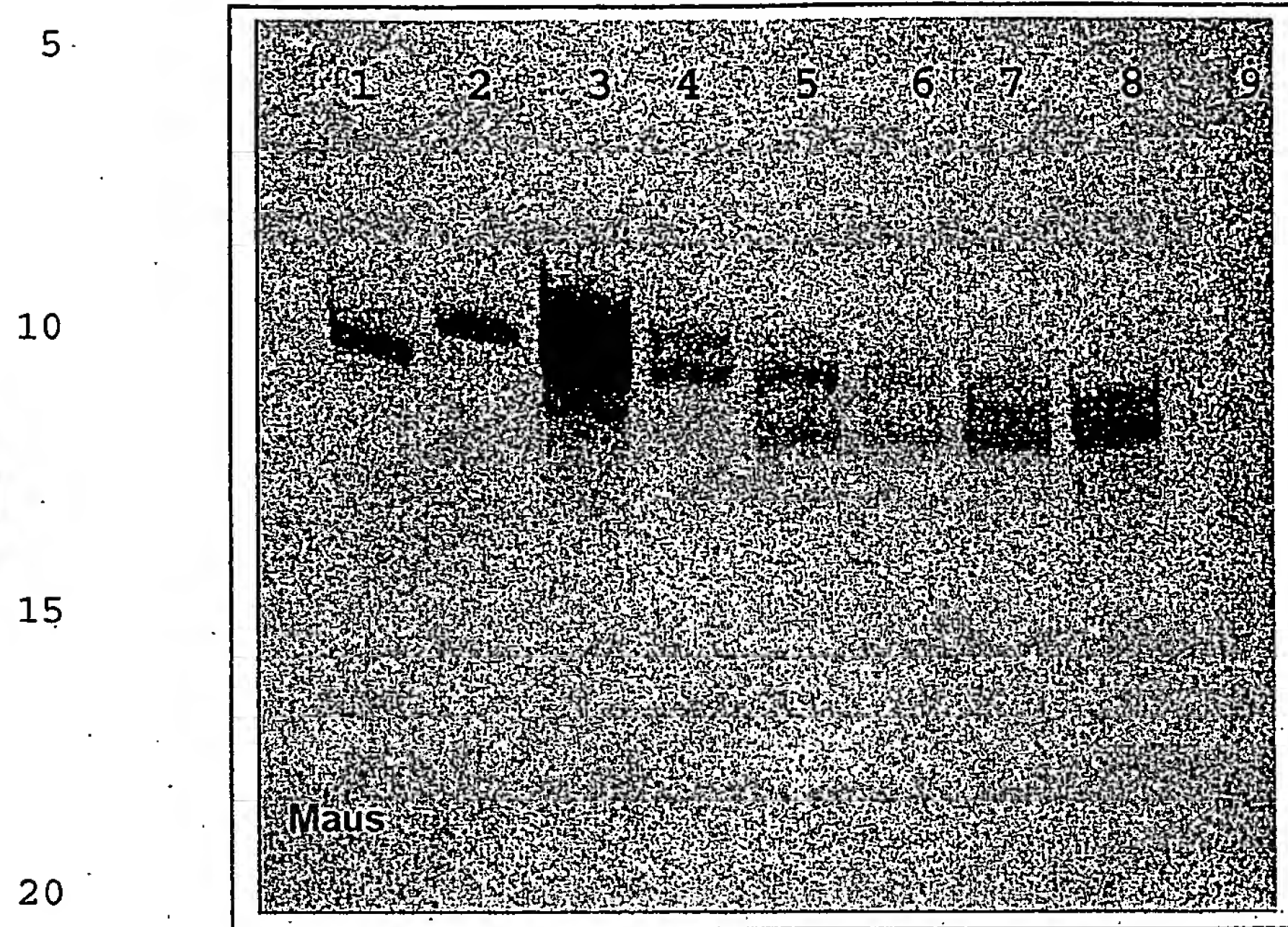


Abb. 12

5

10

15

20

25

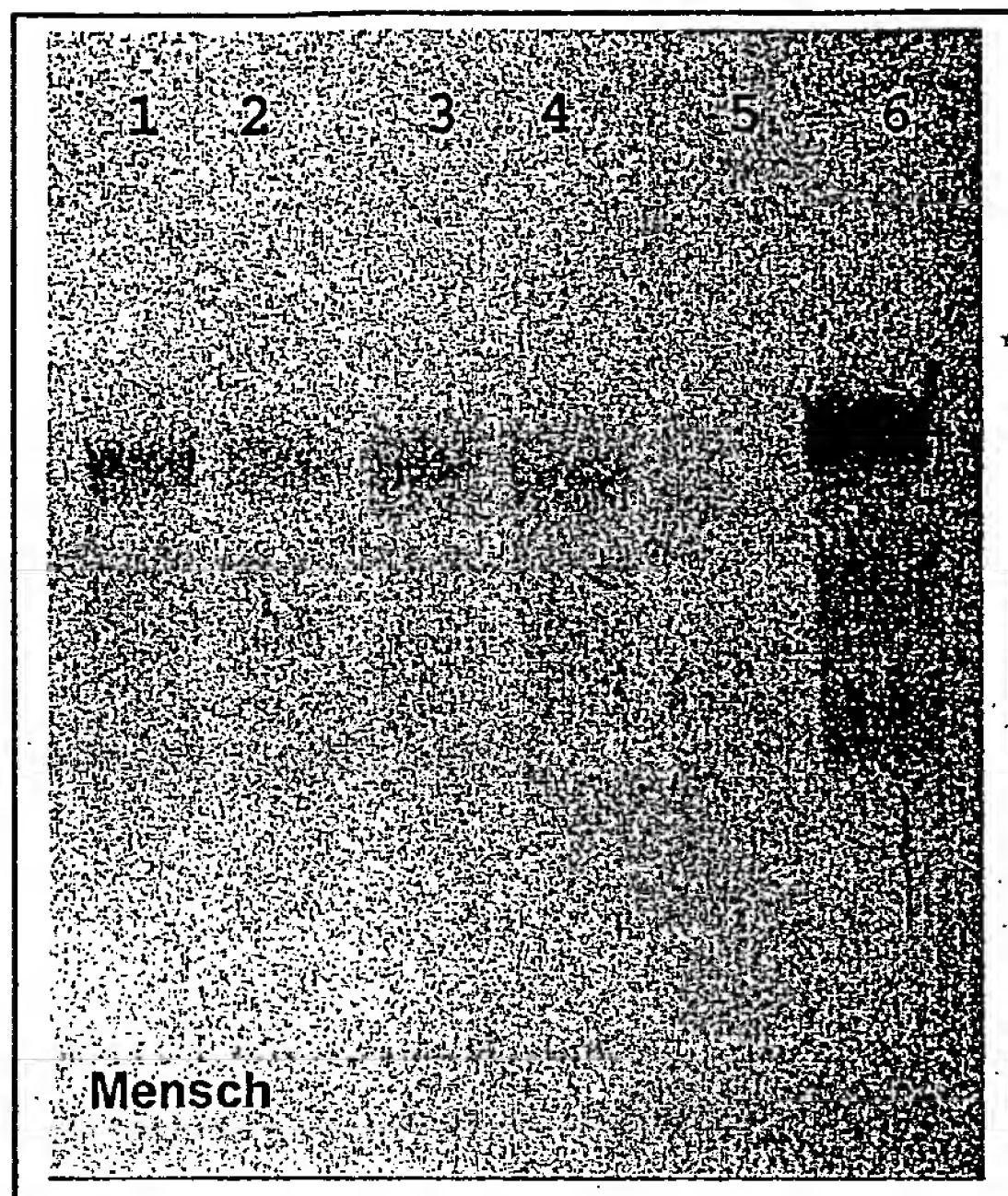


Abb. 13

5

10

15

20

25

30

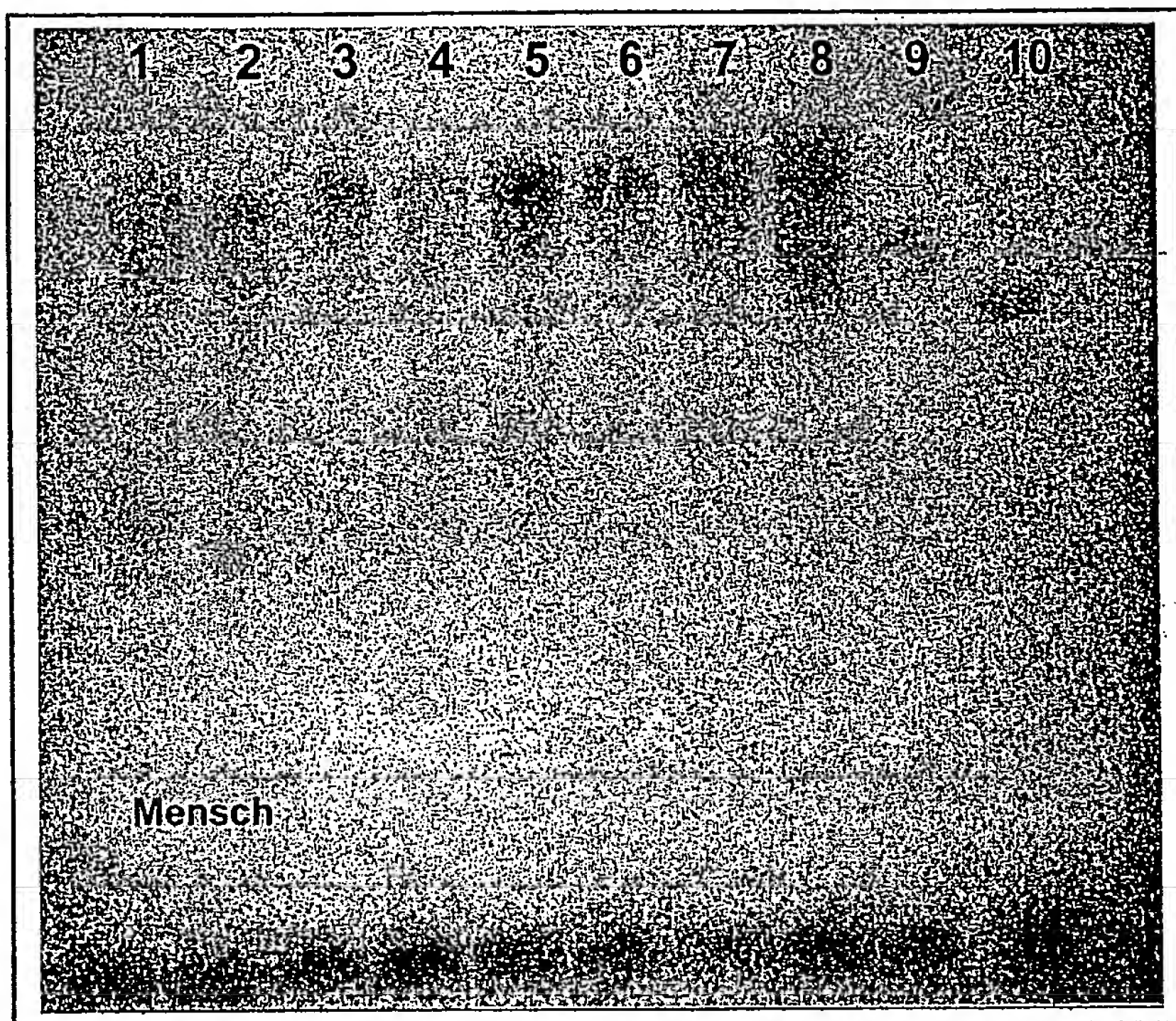




Abb.14

5

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

10

15

20

25

